

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Fyzikální chemie



Dušan Spáčil

Povrchem-zesílený rezonanční Ramanův rozptyl Zn(II) porfyrinů v systémech s
agregovanými a neagregovanými Ag nanočásticemi
Surface-enhanced resonance Raman scattering of Zn(II) porphyrins in systems with
aggregated and non-aggregated Ag nanoparticles

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Blanka Vlčková, CSc.

Školitel - konzultant: Doc. RNDr. Peter Mojzeš, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. května 2011

Podpis

Chtěl bych poděkovat vedoucí diplomové práce Prof. RNDr. Blance Vlčkové, CSc. za odborné vedení, cenné připomínky a konzultace při vypracovávání diplomové práce.

Dále bych chtěl poděkovat konzultantovi Doc. RNDr. Peteru Mojžešovi, CSc. za experimentální pomoc při měření RRS, SERRS a SERRRS spekter a za pomoc při zpracování experimentálních dat pomocí faktorové analýzy.

Mé poděkování patří též RNDr. Miroslavu Šloufovi, PhD. a paní Jiřině Hromádkové za experimenty na TEM.

Dále bych chtěl poděkovat kolegyním a kolegovi v laboratoři za zaškolení v problematice SERSu, konkrétně RNDr. Ivaně Šloufové, PhD., RNDr. Petru Šmejkalovi PhD., Mgr. Magdaléně Sládkové a Bc. Markétě Kokoškové.

Závěrem bych chtěl poděkovat Grantové agentuře Univerzity Karlovy a Grantové agentuře České republiky za finanční podporu.

Abstrakt v českém jazyce:

V této diplomové práci byla měřena a interpretována SERRS (Surface – enhanced resonance Raman Scattering) a SERS (Surface – enhanced Raman Scattering) spektra, spektra plasmonové extinkce (SPE) a TEM snímky systémů obsahujících kationtový zinkový porfyrin ZnTMPyP a nanočástice Ag (Ag NČ). Byly studovány jednak systémy s izolovanými nanočásticemi, jednak systémy s kompaktními agregáty Ag NČ. Systémy s izolovanými částicemi byly tvořeny přidáním ZnTMPyP k hydrosolu Ag NČ. K tomuto systému byl přidán chlorid sodný, čímž vznikl systém s kompaktními agregáty. SERRS a SERS spektra ZnTMPyP při $\lambda_{\text{exc}} = 441,6$ nm a 532 nm byla studována nejprve stacionárně v připravených systémech, a posléze v dynamickém vývoji systémů Ag NČ (hydrosol) \rightarrow Ag NČ/ ZnTMPyP \rightarrow Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl po dobu 680 s. Časové vývoje SERRS a SERS spektra byly podrobeny faktorové analýze (FA) a doplněny studií časového vývoje SPE spekter systémů. FA ukázala především výrazný nárůst signálu ZnTMPyP spojený s přidavkem NaCl, tedy s konverzí systému s izolovanými nanočásticemi na systémy s kompaktními agregáty Ag NČ. V případě systémů s nejvyššími koncentracemi ZnTMPyP byl nárůst signálu následován jeho poklesem. FA byly rovněž určeny meze SERRS ($\lambda_{\text{exc}} = 441,6$ nm) a SERS ($\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm) spektrální detekce ZnTMPyP v obou typech systémů a porovnávány s hodnotami mezí detekce ze stacionárních měření. Bylo zjištěno, že při $\lambda_{\text{exc}} = 441,6$ nm je mez SERRS spektrální detekce ZnTMPyP v systému s izolovanými nanočásticemi $5 \cdot 10^{-7}$ M a v systému s kompaktními agregáty $5 \cdot 10^{-9}$ M. Při $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm byla zjištěna mez SERS spektrální detekce $5 \cdot 10^{-5}$ M pro systém s izolovanými nanočásticemi a pro systém s kompaktními agregáty $5 \cdot 10^{-6}$ M v případě stacionárních měření a o řád nižší v případě dynamických měření. Výrazný pokles mezí SERRS a SERS spektrální detekce ZnTMPyP v systému s kompaktními agregáty oproti systému s izolovanými nanočásticemi je plně v souladu s pozorovaným nárůstem intenzity SERRS a SERS signálu a je vysvětlen lokalizací ZnTMPyP do velmi silných optických polí („hot spots“) v kompaktních agregátech. Testovací studie SERS a SPE spekter systémů s Ag NČ a kationty 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinia a 1-ethyl-3-methylimidazolia pak prokázaly, že tyto kationty nejsou vhodnými referentními nechromoforovými adsorbáty pro SERS spektrální studie.

Abstract in English:

In this diploma thesis, SERRS (Surface – enhanced resonance Raman Scattering) and SERS (Surface – enhanced Raman Scattering), surface of plasmon extinction spectra and TEM images of systems with tetracationic zinc porphyrin ZnTMPyP and silver nanoparticles (Ag NPs) were studied and interpreted. The systems with isolated nanoparticles and the systems with compact aggregates were investigated. The systems with isolated nanoparticles were prepared by addition of ZnTMPyP to hydrosol of Ag NPs. NaCl was added to this system and so compact aggregates were prepared. SERRS and SERS spectra of ZnTMPyP were studied at excitation wavelengths $\lambda_{\text{exc}} = 441.6$ nm and 532 nm. Firstly, stationary systems and secondly dynamic development of hydrosol Ag NPs \rightarrow Ag NPs/ ZnTMPyP \rightarrow Ag NPs/ ZnTMPyP/ NaCl systems for 680 s was investigated. Time evolution of SERRS and SERS spectra were analyzed by factor analysis (FA) and time evolution of spectra extinction plasmon were measured. FA showed a strong increase of the signal of ZnTMPyP after the addition of NaCl, i.e. after conversion of isolated nanoparticles to compact aggregates. In these systems with high concentration of ZnTMPyP the increase of signal was succeeded by its decrease. With help of FA the limit of SERRS spectral detection ($\lambda_{\text{exc}} = 441.6$ nm) and limit of SERS spectral detection ($\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm) were determined in both types of systems, and compared with those obtained from stationary measurement. It was found out that the limit of SERRS spectral detection is $5 \cdot 10^{-7}$ M for system with isolated nanoparticles and $5 \cdot 10^{-9}$ M for system with compact aggregates at 441.6 nm. The limit of SERS spectral detection is $5 \cdot 10^{-5}$ M for system with isolated nanoparticles and $5 \cdot 10^{-6}$ M in system with compact aggregates at 532 nm and in stationary measurement. In case of dynamic measurements the limit of SERS spectral detection of ZnTMPyP in system with compact aggregates is lower by one order of magnitude. A significant decrease of SERRS and SERS spectral detection limits of ZnTMPyP in the systems with compact aggregates of Ag NPs as compared to those in the system with isolated NPs is in full agreement with the observed increase of SERRS and SERS signals and it is explained by localization of ZnTMPyP into strong nanoscale localized optical fields (“hot spots”) excited in compact aggregates. Test study of SERS and SPE spectra of system Ag NPs and cation 1,1'-dimethyl 4,4'-bipyridinium and 1-ethyl-3-methylimidazolium showed, that these cations are not suitable reference non-chromophoric adsorbates for SERS spectral studies.

Klíčová slova:

Nanočástice stříbra, agregace, porfyrin, povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS), povrchem zesílený rezonanční Ramanův rozptyl (SERRS), elektronová absorpční spektra, transmisní elektronová mikroskopie (TEM), methylviologen, ZnTMPyP, 1-ethyl-3-methylimidazolium

Keywords:

Ag nanoparticles, aggregation, porphyrin, surface-enhanced Raman scattering (SERS), surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS), electronic absorption spectra, transmission electron microscopy (TEM), methylviologen, ZnTMPyP, 1-ethyl-3-methylimidazolium

Obsah

1.	Úvod	9
1.1.	Povrchem zesílený Ramanův rozptyl a rezonanční Ramanův rozptyl.....	9
1.2.	Faktory zesílení.....	9
1.2.1.	Elektromagnetický mechanismus.....	10
1.2.2.	Mechanismus molekulární rezonance	12
1.3.	SERS aktivní povrchy	13
1.4.	Příprava a charakteristika SERS aktivních systémů s hydrosoly Ag NČ.....	14
1.4.1.	Metody přípravy nanočástic	14
1.4.2.	Příprava Ag NČ	15
1.4.3.	Charakterizace systémů s hydrosoly Ag NČ	15
1.5.	Porfyriny.....	16
2.	Cíle práce.....	18
3.	Experimentální část	19
3.1.	Chemikálie	19
3.1.1.	Příprava nanočástic stříbra	20
3.1.2.	Příprava roztoku ZnTMPyP	20
3.1.3.	Příprava roztoku chloridu sodného	20
3.1.4.	Příprava roztoku methylviologenu	20
3.1.5.	Příprava roztoku EMIM	21
3.2.1.	Příprava vzorků na měření RRS	21
3.3.	Příprava SERRS/ SERS aktivních systémů	21
3.4.	Příprava vzorků pro TEM	23
3.4.1.	Příprava nosných povrchů.....	23
3.5.	Instrumentace	24
3.6.	Teorie faktorové analýzy.....	24
4.	Výsledky a diskuze.....	27
4.1.	Spektrální charakteristiky výchozího hydrosolu Ag NČ a ZnTMPyP	27
4.2.	Agregace Ag NČ v systémech hydrosol Ag NČ a ZnTMPyP v závislosti na koncentraci porfyrinu.....	29
4.3.	Spektrální a morfologické charakteristiky systémů Ag NČ /ZnTMPyP a Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl	31

4.4. SERS/ SERRS spektra systémů hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP a hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl	31
4.5. Rezonační Ramanův rozptyl ZnTMPyP	37
4.6. Porovnání mezi SER(R)S a (R)RS spektrální detekce ZnTMPyP	38
4.7. SERS/ SERRS spektra systémů hydrosol Ag NČ, hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP, hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl – excitační vlnová délka 441,6 nm – dynamické měření	39
4.7.1. Průběh experimentu.....	39
4.7.2. Faktorová analýza	41
4.7.4. SERS spektra systémů hydrosol Ag NČ, hydrosol Ag NČ/ZnTMPyP, hydrosol..	48
4.7.5. Srovnání mezi SERRS a SERS spektrální detekce ze stacionárních a dynamických měření.....	53
4.8. SPE systémů hydrosol Ag NČ, hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP a hydrosol Ag/ ZnTMPyP/ NaCl – dynamická měření.....	54
4.9. Výběr referentního nechromoforového adsorbátu	57
4.9.1. Ramanova spektroskopie methylviologenu	57
4.9.2. SPE systémů hydrosol Ag NČ, hydrosol Ag NČ/ methylviologen a hydrosol Ag NČ/ methylviologen/ NaCl – dynamická měření	60
4.9.3. Testování EMIM jako referentního nechromoforového adsorbátu.....	64
5. Závěr.....	65
6. Seznam použité literatury	67
7. Seznam použitých zkratk a symbol	70

1. Úvod

1.1. Povrchem zesílený Ramanův rozptyl a rezonanční Ramanův rozptyl

Spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu je metoda, která je založena na principu povrchem zesíleného Ramanova rozptylu nebo povrchem zesíleného rezonančního Ramanova rozptylu (Surface – enhanced Raman Scattering (SERS), Surface – enhanced resonance Raman Scattering (SERRS)). Při obecném zařazení této metody, je možno konstatovat, že tato metoda patří mezi vibračně – spektroskopické metody. Možnosti uplatnění našla tato metoda v kvalitativní analýze, v katalýze a adsorpci. Široké uplatnění lze též nalézt při studiu biologicky důležitých molekul jako např. DNA.

Počátky o povrchem zesíleném Ramanově rozptylu jsou spjaty s Fleischmannem, van Duynem a Creightonem.¹⁻³ Fleischmann jako první pozoroval SERS pyridinu adsorbovaného na stříbrné elektrodě v roce 1974.¹ Při tomto experimentu pozoroval velký nárůst intenzity signálu, ačkoli nevěděl, že se jedná právě o SERS. Kvantifikovat tento jev dokázal o tři roky později, v roce 1977, van Duyne. Ten ve své práci ukázal, že je možno zvýšit intenzitu signálu Ramanova rozptylu díky faktoru povrchového zesílení až 10^7 . Stejně jako Fleischmann experimentoval s pyridinem adsorbovaném na stříbrné elektrodě.²

Bylo zjištěno, že nutnou podmínkou pro SERS je adsorpce molekuly na povrchy nanostruktury, např. silně vodivých nanočástic kovů. Nejlepší výsledky jsou pozorovány u nanočástic stříbra, zlata a mědi. Soudobé výsledky též ukazují možnosti použití bimetalických nanočástic či nanočástic typu core – shell.^{7,8} Byly rovněž použity i nanočástice jiných kovů, ovšem faktor zesílení byl vždy menší než při použití nanočástic stříbra. K tomu, aby mohl nastat SERS musí být ještě splněna podmínka, podle které musí být povrchové nerovnosti menší než vlnová délka excitačního zdroje.

1.2. Faktory zesílení

Faktor celkového zesílení povrchem zesíleného Ramanova rozptylu je definován jako poměr intenzity SERS signálu a signálu normálního Ramanova rozptylu za konstantního počtu rozptylujících molekul. Celkový faktor zesílení je složen ze dvou příspěvků hlavních mechanismů:

1. Elektromagnetický mechanismus.^{9,10}
2. Mechanismus molekulární rezonance.¹¹

V Ramanově rozptylu lze intenzitu rozptýleného záření definovat pomocí dipólového momentu. Dipólový moment je definován jako součin tenzoru polarizovatelnosti molekuly α a vektoru intenzity elektrické složky elektromagnetického pole \vec{E} .

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} \quad (1.1.)$$

$$I_{RS} \approx |\vec{P}|^2 \quad (1.2.)$$

Jak z rovnice (1.1.) a (1.2.) vyplývá, je možno velikost intenzity rozptýleného záření ovlivňovat. Lze tak uskutečnit zvýšením intenzity elektrického pole v místě, kde se molekula nachází nebo zvýšením polarizovatelnosti molekuly α . V Ramanově rozptylu je nejdůležitější složkou změna polarizovatelnosti, složka $(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_k})_0$ podle vibrační souřadnice Q_k . Tenzor polarizovatelnosti je poté možno rozepsat:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k \quad (1.3.)$$

1.2.1. Elektromagnetický mechanismus

Hlavním mechanismem povrchem zesíleného Ramanova rozptylu je elektromagnetický mechanismus. Tento mechanismus nastává, jestliže dojde k interakci dopadajícího elektromagnetického záření s nanočásticí vhodného kovu při splnění rezonanční podmínky Mieova rozptylu (rovnice 1.4). Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.1. je důležité použít nanočástice tzv. plasmonických kovů, tedy nanočástice stříbra, zlata nebo mědi. Jako zdroj elektromagnetického záření je používán laser, který poskytuje koherentní a monochromatické záření.

$$\lambda_{exc} = \lambda_{res} \quad (1.4.)$$

V této diplomové práci bude zaměřena pozornost na systémy s Ag NČ, které se nejvíce vyskytují v SERS. Ag NČ jsou obvykle mnohočlenné osamocené krystaly (vyšší polyedry – dodekaedry a ikosaedry), nicméně pro jednoduchou teoretickou studii jsou aproximovány na izolovanou kouli. Nejprve bude vysvětleno jak a kde Ag NČ fungují jako zesilovače světla.

Když je malá Ag NČ ozářena zářením určité vlnové délky za splnění podmínky Mieovy rezonance, valenční elektrony v nanočástici začnou oscilovat při stejné frekvenci jako záření a je vytvořen oscilující dipól. Rezonanční excitace tohoto dipólu se nazývá též excitace

dipolárního povrchového plasmonu. V jednoduché kvazistatické aproximaci je dipól popsán dipólovým momentem P :

$$P = gr^3 E_0 \quad (1.5.)$$

kde E_0 je intenzita elektrického pole vyskytujícího se záření, r je poloměr nanočástice a g je faktor charakterizující materiál v systému,

$$g_0 = \frac{\varepsilon(\lambda) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\lambda) + 2\varepsilon_0} \quad (1.6.)$$

kde $\varepsilon(\lambda)$ je relativní komplexní permitivita (dielektrická funkce) kovu (v tomto případě stříbra) a ε_0 je relativní permitivita (dielektrická konstanta) prostředí (obvykle vody nebo vzduchu) obklopující Ag NČ.

Materiálové vlastnosti kovu (Ag) a prostředí souvisí s jejich optickými vlastnostmi, především s komplexním indexem lomu kovu $N(\lambda) = n + ik$ (kde n je index lomu a k je index absorpce) a s indexem lomu prostředí n_0 , o kterém se předpokládá, že je neabsorbující při průchodu viditelnou oblastí spektra a tudíž $k_m = 0$

$$\varepsilon(\lambda) = N^2(\lambda) \quad \varepsilon_0 = (n_0)^2 \quad (1.7.)$$

Faktor g a dipólový moment P je maximální, jestliže je splněna podmínka rezonance

$$\operatorname{Re} \varepsilon(\lambda) \rightarrow -2\varepsilon_0 \quad (1.8.)$$

a $\operatorname{Im} \varepsilon(\lambda)$, které reprezentuje rezonanční tlumení, je velmi malé.

Rezonanční vlnová délka, při které jsou splněny podmínky rezonance pro izolované Ag koule ve vodě, je přibližně 390 nm a reálný systém, odpovídající tomuto popisu, je hydrosol Ag NČ.

Důležitým faktorem je, že oscilující dipól emituje záření. Intenzita tohoto záření je úměrná čtverci velikosti dipólového momentu:

$$I \approx \left(\frac{1}{\lambda} \right)^4 / P^2 \quad (1.9.)$$

Tudíž při excitaci zářením o rezonanční vlnové délce, Ag NČ fungují jako zesilovače záření.¹² V EM mechanismu SERS dochází k zesílení jak dopadajícího záření, tak i záření Ramansky rozptýleného. Zesílení Ramanova rozptylu adsorbované molekuly na izolovaných Ag NČ je přibližně 10^4 .

Nicméně systémy v interagujících Ag NČ jsou mnohem lepší zesilovače než systémy s izolovanými nanočásticemi. Na interagující nanočástice působí vzájemná interakce dipól

dipól. Ve většině případů je pozorován červený posun a rozšiřování oblasti rezonanční vlnové délky. V některých systémech interagujících nanočástic dochází k výrazné prostorové lokalizaci zesílení signálu po optické excitaci laserovým zářením. Nanooblasti, ve kterých je silné EM pole jsou nazývány „hot spots“. Existence „hot spots“ byla předpověděna teoreticky a experimentálně ověřena jak u fraktálních agregátů Ag NČ¹³⁻¹⁹, tak i v dimérech.¹⁵ Faktory vedoucí k zesílení EM mechanismu se pohybují v rozmezí 4 až 11 řádů v závislosti na morfologii systému Ag NČ, umístění molekuly v systému, excitační vlnové délce a polarizaci světla v SERS experimentu.²² Teorie EM mechanismu v SERS byla detailně vysvětlena v referencích^{10, 20, 21}.

K maximálnímu zesílení dochází, jestliže je splněna podmínka:

$$\varepsilon(\lambda) \rightarrow -2\varepsilon_0 \Rightarrow \varepsilon_i(\lambda) = -2\varepsilon_0, \varepsilon_2(\lambda) \rightarrow 0 \quad (1.10.)$$

Z tohoto vztahu je možno usoudit, že čím je větší ε_2 , tím je zesílení signálu menší. Rovněž z tohoto vztahu je možno konstatovat, že velikost zesílení výrazně závisí na typu kovu a rezonanční podmínka je pro různé kovy splněna při různé vlnové délce excitačního záření. Kovy jako Ag, Au, Cu mají rezonanční podmínku splněnou v oblasti vlnových délek ve viditelné oblasti. Další výhodou u těchto kovů je, že mají poměrně nízkou hodnotu ε_2 . Kombinací těchto dvou faktorů je, že tyto kovy mají ostré plasmonové rezonance s malým tlumením. Jiné kovy jako Pt, Pd mají podmínku plasmonové rezonance splněnu v UV oblasti.

1.2.2. Mechanismus molekulární rezonance

Rezonanční Ramanův rozptyl (RRS) nastává v případě, že se energie budícího zdroje shoduje s energií dovoleného přechodu v molekule. Tento jev je doprovázen zvýšením intenzity neelasticky rozptýleného záření.

V některých případech může být mechanismus molekulární rezonance kombinován s EM mechanismem. Toto nastane, jestliže v blízkosti SERS aktivního povrchu jsou splněny podmínky buzení povrchových plasmonů v kovu a současně molekulárně excitovaného stavu. Zjištění zdali je tato podmínka uskutečněna u RRS lze pomocí absorpčních spekter. U SERSu kde dochází k interakci molekuly s povrchem kovu, které má za následek porušení energetických hladin v molekule, je situace komplikovanější. K přesnému zjištění příspěvku molekulární rezonance lze dojít pomocí měření SERS spekter pro různé vlnové délky a zjistit tak excitační profily pásů.

Podmínku působení mechanismu molekulární rezonance lze shrnout v rovnici 1.11.:

$$\lambda_{exc} = \lambda_{res} = \lambda_{MR} \quad (1.11.)$$

kde λ_{exc} je vlnová délka excitačního zdroje, λ_{res} je vlnová délka rezonance a λ_{MR} je vlnová délka molekulární rezonance. Mechanismus molekulární rezonance je molekulárně specifický, tzn. že působení závisí na struktuře molekuly. Jeho faktor zesílení poté může činit $10^2 - 10^3$.

1. Chromoforové molekuly:

Ve většině případů se předpokládá, že jsou molekuly adsorbovány, ale dochází pouze ke slabému ovlivnění jejich elektronových hladin. Z absorpčního spektra neadsorbované molekuly je poté možno odhadnout při které λ_{exc} bude přispívat molekulární rezonance. V případě chromoforových molekul dochází k jevu, který je označován SERRS. Příkladem takovéto molekuly je např. ZnTMPyP.

2. Nechromoforové molekuly

V tomto případě je volná molekula nechromoforem, avšak vytváří chromoforový povrchový komplex. V tomto komplexu dochází k vazbě kov – adsorbát pomocí chemisorpce. V takovém povrchovém komplexu musí být excitační záření v rezonanci s charge – transferovým přechodem. Tento případ lze označit jako chemický mechanismus SERSu. Příkladem takového povrchového komplexu je Ag – 2,2'-bipyridyl.

1.3. SERS aktivní povrchy

Při povrchem zesíleném Ramanově rozptylu je důležité mít povrchy, které tento efekt umožňují. Pro SERS a SERRS je velice výhodné použít agregované hydrosoly. K tomu, aby agregace v hydrosolu nastala, je nejprve nutné ji vyvolat, což může být učiněno pomocí preagregačního činidla (např. chloridovými ionty) nebo samotným adsorbátem. Samotnou agregaci je poté možno pozorovat pomocí změn v plasmonové extinkci. Další možností je použití transmisní elektronové mikroskopie. Zatímco u plasmonové extinkce lze pozorovat změnu zabarvení hydrosolu, u snímků z TEM, je možno pozorovat shlukování částic. V důsledku agregace dochází k vzájemné interakci excitovaných dipólů na nanočásticích.

Pro popis těchto interakcí byly vyvinuty teoretické modely. Aravind *et al.*²³ použil jednoduchý model dvou interagujících částic, které zobecnil na dvě kovové koule. Výsledkem této studie byla optická závislost na vzdálenosti koulí. Maximum plasmonové extinkce se objeví, jestliže se částice maximálně přiblíží.

Další teoretickou studii udělal Xu *et. al.*, který se zabýval zesílením EM mechanismu SERSu.¹⁵ Pro svou studii použili totožný model dvou koulí. Výsledkem této studie bylo zjištění, že faktor zesílení v prostoru spojnice dvou Ag koulí, jejichž vzdálenost je výrazně menší než jejich poloměr, může nabývat hodnot až 10^{11} . Ve své studii rovněž zmiňují použití

jiného modelového systému – systému tvořeného dvěma pronikajícími koulemi. Jejich výsledky ukazují, že zesílení EM mechanismu v tomto typu systému může být až 10^8 . V práci Šloufové *et al.* bylo zjištěno, že experimentální realizací takového systému jsou kompaktní agregáty.²⁴ V kompaktních agregátech tvořených adsorpcí chloridových iontů, a dále v dimerech a ve fraktálních agregátech vznikají „hot spots“, tzn. prostorově lokalizovaná místa po optické excitaci, kde dochází výraznému nárůstu signálu.

1.4. Příprava a charakteristika SERS aktivních systémů s hydrosoly Ag NČ

Nanočástice jsou částice o velikosti v rozsahu 1 – 100 nm. Jsou to takové částice, u kterých jsou rozdílné fyzikálně chemické vlastnosti od vlastností objemových (bulkových) materiálů stejného složení. Odlišné vlastnosti se zejména uplatňují v optických, elektrických, katalytických či reologických vlastnostech.

Z literatury je možno popisovat vznik nanočástic pomocí dvou přístupů. U syntetického postupu je tak, že malé objekty se slučují a vznikají tak větší částice. Protikladem je desagregační přístup, kde se postupuje od většího k menšímu.

1.4.1. Metody přípravy nanočástic

Přípravu nanočástic lze rozdělit do dvou základních typů podle toho, jestli se zvolí fyzikální nebo chemická metoda.

1.4.1.1. Fyzikální metody

Mezi fyzikální metody je možno zařadit následující metody: laserovou ablaci, odpařování elektronovým svazkem, jiskrovou erozi. Laserová ablace je metoda, která využívá laserového paprsku. Tento paprsek ozařuje kovový terčik, ze kterého se následně uvolní nanočástice. Metoda odpařování elektronovým svazkem se zejména používá pro nanášení vrstev na optické čočky a filtry. Další možností je použití pro nanášení izolačních vrstev a odpudivých filmů na elektronické komponenty. V metodě jiskrové eroze jsou dvě elektrody z daného materiálu připojeny ke zdroji elektrického napětí, čímž dochází ke vzniku elektrického oblouku. Dojde k odpaření materiálu, který se rychle zkondenzuje na malé částice.

Výhodou použití výše uvedených fyzikálních metod je příprava kvalitnějších vrstev nebo částic s úzkou distribucí nanočástic. Nevýhodou lze spatřovat ve vysokých nákladech na pořízení aparatury.

1.4.1.2. Chemické metody

Kromě použití fyzikální metod je možno připravit nanočástice pomocí chemických metod. Mezi základní metody patří např. metoda sol – gel nebo citrátová metoda. Metoda sol- gel je založena na dvou základních krocích a to hydrolyze a polykondenzaci. Tato metoda se velmi často uplatňuje při přípravě nanočástic oxidů kovů zejména oxidu titaničitého. Citrátová metoda je metoda, kdy se postupuje pomocí vhodného oxidu nebo soli, která se smísí s α -hydroxykarboxylovými kyselinami např. kyselinou citronovou. Tímto krokem vznikne komplex s chelátově vázaným ligandem. Po přidání polyhydroxyalkoholu a zahřívání, dochází v systému k polymerizaci. Vzniklá polymerní pryskyřice se poté dále žihá za vzniku nanočástic.

Výhodou chemických metod jsou nízké pořizovací náklady, ale pouze za cenu širší distribuce velikosti částic.²⁵

1.4.2. Příprava Ag NČ

Pro přípravu Ag NČ lze v literatuře nalézt několik metod. V následujícím odstavci budou shrnuty nejdůležitější metody přípravy Ag NČ. Při přípravě Ag NČ je důležité dbát na velikost připravených Ag NČ. Je prokázáno, že velikost Ag NČ se projeví v intenzitě SERS signálu.²⁶

Nejčastěji používanou chemickou metodu pro přípravu Ag NČ je metoda založená na redukci. K redukci se používají látky jako formaldehyd,²⁷ sacharosa, maltosa a další látky z řady cukrů.^{28,29,30} Další možností je využití hydrazin,³¹ vodík,³² tetrahydridoboritan sodný.^{33,34,35}

Metoda, která bude použita v experimentální části této diplomové práce je založena na redukci dusičnanu stříbrného za pomoci tetrahydridoboritanu sodného. Pomocí této metody se dají připravit Ag NČ o průměrné velikosti 9 nm.³⁵

1.4.3. Charakterizace systémů s hydrosoly Ag NČ

K ověření velikosti Ag NČ slouží zejména následující metody:

1. Rozptylové techniky

Často používanou metodou pro stanovení velikosti nanočástic je metoda založena na rozptylu světla. Tento rozptyl může být buď statický nebo dynamický. Při měření dynamického rozptylu světla se měří fluktuace intenzity rozptýleného světla okolo její průměrné hodnoty. Tyto fluktuace souvisí s interferenčním zeslabováním a zesilováním světla

rozptýleného na nestacionárních částicích disperzní fáze, podléhajících Brownovu pohybu. Při použití této metody není možno určit velikost nanočástic menších než 10 nm.³⁶

2. Extinkční techniky

Při použití UV/Vis spektroskopie je možno měřit spektra plasmonové extinkce, tj. taková spektra, kdy dochází jak k absorpci, tak i k rozptylu záření Ag NČ. Je prokázáno, že vlnová délka absorpčního maxima souvisí s průměrnou velikostí Ag NČ.²⁶

3. Mikroskopické metody

K důkladné charakterizaci Ag NČ slouží elektronově mikroskopické metody. Pro charakterizaci hydrosolů Ag NČ bývá používáno transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Ze snímků z TEM je možno zjistit nejen informace o velikosti Ag NČ, ale také informace o případné agregaci Ag NČ. Pomocí této metody byly charakterizovány systémy o velikosti nanočástic 6,2 nm³⁷, 20 nm³⁸ a 30 – 35 nm,³⁹ ale i větších nanočástic.

1.5. Porfyriny

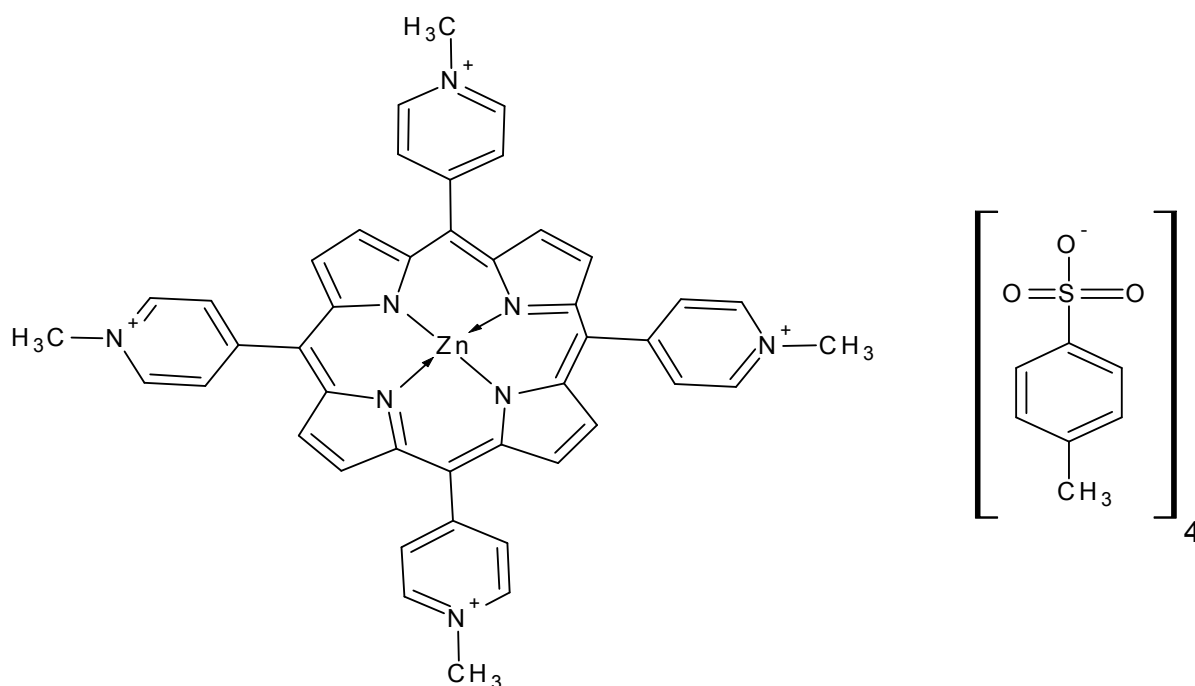
Porfyriny jsou biologicky důležité látky. Bývají často studovány v oblasti diagnostiky a fotodynamické terapie zhoubných nádorů. Tato metoda je založena na aplikaci fotosenzitivní látky (např. ZnTMPyP), která v těle interaguje s nádorovými buňkami. Jestliže se tyto buňky ozáří, světlem o vhodné vlnové délce dochází ke smrti nádorových buněk. Výhodou této metody, oproti jiným metodám, používaným k léčení rakoviny je, že ničí pouze zhoubné buňky. Porfyriny hrají důležitou roli v biochemických reakcích, v oxidacích a v elektronových přenosech. Jejich vlastnosti jsou velmi závislé na substituentech. Porfyriny našly uplatnění v detekci a degradaci nebezpečných látek, nitroaromatických sloučenin a environmentálních polutantů.⁴⁰ Rovněž existují studie zmiňující použití porfyrinů jako senzitivizátoru v solárních člancích Graetzlova typu.⁴¹

V naší výzkumné skupině využíváme porfyrinů jako modelových chromoforových adsorbátů pro studium SERS a SERRS.

Příkladem je studie, která popisuje SERRS tetrakationového měďnatého metaloporfyrinu CuTMPyP. V této studii byla získána SERS spektra měďnatého porfyrinu navázaného na Ag NČ o koncentraci porfyrinu $c_M = 1 \cdot 10^{-9}$ M až $1 \cdot 10^{-6}$ M. Výsledky studie ukazují neagregované Ag NČ v rozmezí koncentrací CuTMPyP $c_M = 1 \cdot 10^{-8}$ M až $2 \cdot 10^{-7}$ M a lineární koncentrační závislost SERRSu metaloporfyrinu. U agregovaných Ag NČ došlo k saturaci a poklesu signálu u koncentrace CuTMPyP $c_M = 3 \cdot 10^{-7}$ M a vyšších. Rovněž tyto

systémy byly charakterizovány pomocí spekter plasmonové extinkce a snímků TEM. SERRS spektra byla studována pomocí excitační vlnové délky 441,6 nm.⁴²

Takto získané experimentální výsledky lze vysvětlit tak, že tetrakationový porfyrin CuTMPyP se adsorbuje na povrch Ag NČ elektrostatickou interakcí mezi kationtovým porfyrinem a vnější aniontovou částí elektrické dvojvrstvy obklopující Ag NČ. Při nízkých pokryvech Ag NČ kationtovým porfyrinem k agregaci Ag NČ nedochází. Teprve při vyšších pokryvech Ag NČ nevykompenzuje kladný náboj porfyrinových molekul záporný náboj vnější části elektrické dvojvrstvy na povrchu Ag NČ, a dochází k agregaci. Obdobný průběh závislosti agregace Ag NČ v systému Ag NČ kationtový metaloporfyrin lze očekávat i pro jiné kationtové metaloporfyriny než je CuTMPyP např. ZnTMPyP (obrázek 1).



Obrázek 1 Strukturní vzorec ZnTMPyP.

2. Cíle práce

Cíle této diplomové práce lze rozdělit do následujících bodů:

1. Vytipovat a otestovat systémy s kationtovým porfyrinem ZnTMPyP a Ag NČ v nichž by tento porfyrin byl:
 - (i) elektrostaticky navázán na izolované Ag NČ
 - (ii) prostřednictvím elektrostatické interakce začleněn do kompaktních agregátů Ag NČ, v nichž po optické excitaci vznikají velmi silná prostorově lokalizovaná pole, tzv. „hot spots“.
2. Proměřit závislost SERRS ($\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$) a SERS ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$) spekter na koncentraci ZnTMPyP a určit meze SERRS a SERS spektrální detekce porfyriu v obou typech systémů při obou zvolených vlnových délkách excitačního záření, vzájemně porovnat získané výsledky a uvést je do souvislostí s morfologiemi obou typů systémů.
3. Metodami SERRS, SERS a SPE prostudovat časově závislý vývoj v systémech hydrosol Ag NČ \rightarrow hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP \rightarrow hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl a vyhodnotit získané výsledky.
4. Vybrat a otestovat vhodný kationtový nechromoforový adsorbát a proměřit meze jeho SERS spektrální detekce v systémech s izolovanými nanočásticemi a kompaktními agregáty.

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie

Při měření byly použity všechny chemikálie v čistotě p.a.. Všechny experimenty a přípravy roztoků byly prováděny s deionizovanou nebo redestilovanou deionizovanou vodou. Byly použity tyto chemikálie:

NaBH_4 – tetrahydridoboritan sodný (Merck)

AgNO_3 – dusičnan stříbrný (Merck)

EtOH – ethanol pro spektroskopii (Merck)

HCl – kyselina chlorovodíková (Lach - Ner)

H_2SO_4 – kyselina sírová (Lach - Ner)

HNO_3 – kyselina dusičná (Lach - Ner)

Aceton (Penta)

Zn(II)meso – Tetra(N-methyl-4-pyridyl) Porfyrin Tetratosylát - (TriporTech)

NaCl – chlorid sodný (Fluka Biochimika, Lachema Brno, Merck)

dichlorid 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinia (methylviologen) (Sigma Aldrich)

1-ethyl 3-methylimidazolium tosylát 98% (EMIM) (Strem Chemicals)

Čištění laboratorního skla a nádobí

1) Všechno laboratorní sklo a nádobí bylo ponořeno do lučavky královské (směs koncentrovaných kyselin dusičné a chlorovodíkové v poměru 1:3) po dobu 30 minut. Poté bylo laboratorní sklo umyto proudem vodovodní vody, deionizované vody a redestilované neionizované vody.

2) Po každém měření bylo všechno laboratorní sklo a nádobí namočeno do směsí kyselina sírová: peroxid vodíku v poměru 1:2. Poté bylo laboratorní sklo umyto proudem vodovodní vody, deionizované vody a redestilované neionizované vody.

3.1.1. Příprava nanočástic stříbra

Pro přípravu nanočástic stříbra byla zvolena metoda přípravy podle Garellové³⁵ dále upravená dle Vlčkové⁴³ procedury (ii). Tento postup je založen na redukci dusičnanu stříbrného tetrahydridoboritanem sodným ve vodném prostředí. Při přípravě bylo 3,5 mg NaBH_4 rozpuštěno v 75 ml redestilované deionizované vody (získaný roztok má koncentraci $1,2 \cdot 10^{-3}$ M). Dále bylo rozpuštěno 6,76 mg AgNO_3 rozpuštěno v 18 ml redestilované deionizované vody (získaný roztok má koncentraci $2,2 \cdot 10^{-3}$ M). Oba roztoky se ochladí na teplotu 2 °C. K chlazení bylo použito směsi led/ NaCl.

K roztoku NaBH_4 bylo za stálého míchání na magnetické míchačce 10 ml skleněnou pipetou přikapáno konstantní rychlostí 9 ml AgNO_3 . Vzniklý hydrosol Ag NČ byl míchán na magnetické míchačce dále 45 minut. Během této doby došlo k ohřevu hydrosolu Ag NČ na laboratorní teplotu.

3.1.2. Příprava roztoku ZnTMPyP

Pro přípravu zásobního roztoku bylo použito 7,14 mg krystalického ZnTMPyP, který byl rozpuštěn ve 100 ml redestilované deionizované vody. Výsledná koncentrace zásobního roztoku ZnTMPyP činila $5 \cdot 10^{-5}$ M. Takto připravený zásobní roztok byl použit pro měření RS, RRS, SERS, SERRS, plasmonové extinkce a snímků z TEM. Dále byl připraven roztok o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ M pro měření RRS. Tento roztok byl získán rozpuštěním 0,71 g ve 100 ml redestilované deionizované vody.

3.1.3. Příprava roztoku chloridu sodného

Pro přípravu zásobního roztoku chloridu sodného bylo použito 2,92 g krystalického chloridu sodného. Tento krystalický chlorid sodný byl rozpouštěn v 50 ml redestilované deionizované vody. Výsledná koncentrace činila 1 M. V prvním roce měření byl použit NaCl od firmy Merck. Ve druhém roce od firmy Fluka Biochimica. Rovněž byl otestován NaCl od firmy Lachema Brno.

3.1.4. Příprava roztoku methylviologenu

Pro přípravu zásobního roztoku methylviologenu bylo použito 0,13 g krystalického methylviologenu, který byl rozpuštěn ve 100 ml redestilované deionizované vody. Výsledná koncentrace zásobního roztoku methylviologenu byla $5 \cdot 10^{-3}$ M.

3.1.5. Příprava roztoku EMIM

Pro přípravu zásobního roztoku EMIM bylo použito 71 mg iontové kapaliny. Tato iontová kapalina byla rozpuštěna v 5 ml redestilované deionizované vody. Výsledná koncentrace zásobního roztoku 1-ethyl 3-methylimidazolia byla $5 \cdot 10^{-2}$ M.

3.1.6. Příprava vzorků ZnTMPyP a methylviologenu na Ramanovu mikrospektroskopii

Krystalické vzorky ZnTMPyP a methylviologenu byly pomocí lepící pásky připevněny na podložní mikroskopické sklíčko.

3.2. Příprava systémů pro měření spekter plasmonové extinkce

Ke 2 ml hydrosolu Ag NČ bylo přidáno 20 μ l ZnTMPyP o dané koncentraci – viz tabulka číslo 1.

Objem		Výsledná
hydrosolu	Ag	koncentrace
Objem a koncentrace		ZnTMPyP v
NČ		systému
2 ml	20 μ l $5 \cdot 10^{-5}$ M	$5 \cdot 10^{-7}$ M
2 ml	40 μ l $5 \cdot 10^{-5}$ M	$1 \cdot 10^{-6}$ M
2 ml	60 μ l $5 \cdot 10^{-5}$ M	$1,5 \cdot 10^{-6}$ M
2 ml	20 μ l $5 \cdot 10^{-7}$ M	$5 \cdot 10^{-9}$ M
2 ml	20 μ l $5 \cdot 10^{-8}$ M	$5 \cdot 10^{-10}$ M

Tabulka 1 Vztah mezi koncentrací připraveného roztoku ZnTMPyP a výslednou koncentrací ZnTMPyP v systému.

3.2.1. Příprava vzorků na měření RRS

Do kyvety bylo odpipetováno 2 ml ZnTMPyP o dané koncentraci.

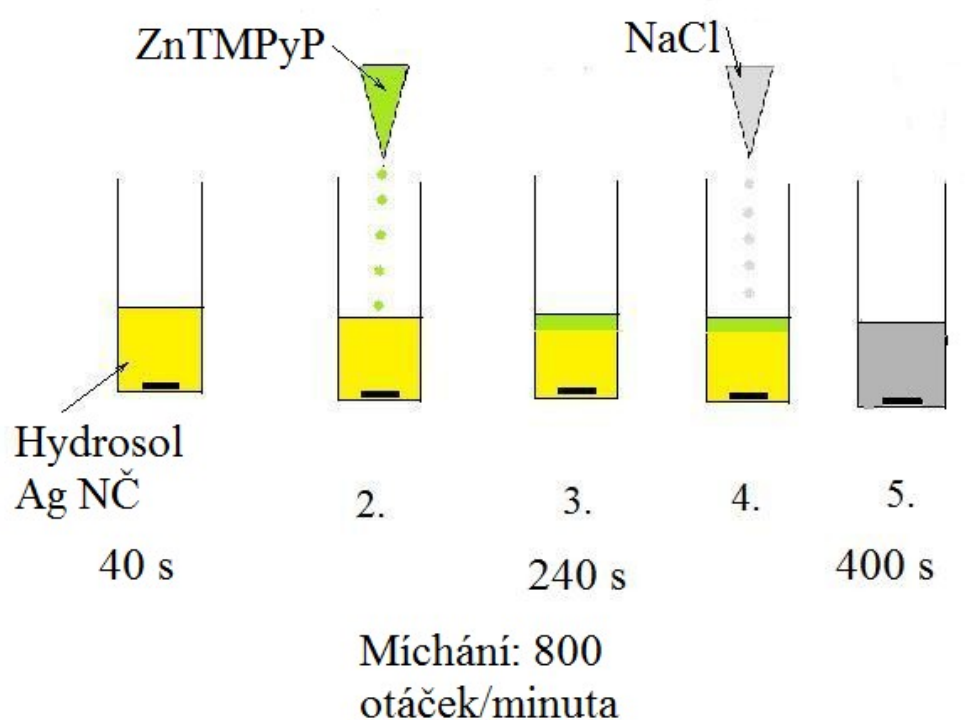
3.3. Příprava SERRS/ SERS aktivních systémů

Ag NČ/ZnTMPyP a Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl

Ke 2 ml hydrosolu Ag NČ připravených podle postupu uvedeného v kapitole 3.1.1. bylo přidáno 20 μ l vodného roztoku ZnTMPyP. Koncentrace přidávaných roztoků jsou uvedeny níže v tabulce číslo 2. K takto připraveným systémům bylo dále přidáváno 100 μ l 1 M NaCl. U stacionárních měření – viz kapitoly 4.2, 4.3) byl systém připraven předem a napipetován do kyvety. U dynamických měření byl zvolen postup, který je uveden u obrázku č. 1.

Objem hydrosolu	Ag	Objem a koncentrace roztoku ZnTMPyP	Výsledná koncentrace ZnTMPyP v systému
NČ			
2 ml		20 μ l $5 \cdot 10^{-5}$ M	$5 \cdot 10^{-7}$ M
2 ml		20 μ l $5 \cdot 10^{-6}$ M	$5 \cdot 10^{-8}$ M
2 ml		20 μ l $5 \cdot 10^{-7}$ M	$5 \cdot 10^{-9}$ M
2 ml		20 μ l $5 \cdot 10^{-8}$ M	$5 \cdot 10^{-10}$ M

Tabulka 2 Vztah mezi koncentrací připraveného ZnTMPyP v roztoku a výslednou koncentrací ZnTMPyP v systému před přidávkem NaCl.



Obrázek 1 Znázornění dynamických měření systému Ag/ ZnTMPyP /NaCl.

Ag NČ/ methylviologen a Ag NČ/ methylviologen/ NaCl

Ke 2 ml hydrosolu Ag NČ připravených podle postupu uvedeného v kapitole 3.1.1. bylo přidáno 20 μ l vodného roztoku methylviogenu. Koncentrace přidávaných roztoků jsou

uvedeny níže v tabulce číslo 3. K takto připraveným systémům bylo dále přidáváno 100 μl 1 M NaCl.

Objem		Výsledná
hydrosolu	Ag	koncentrace
Objem a koncentrace methylviologenu		methylviologenu
NČ		v systému
2 ml	20 μl $5 \cdot 10^{-3}$ M	$5 \cdot 10^{-5}$ M
2 ml	20 μl $5 \cdot 10^{-4}$ M	$5 \cdot 10^{-6}$ M
2 ml	20 μl $5 \cdot 10^{-5}$ M	$5 \cdot 10^{-7}$ M
2 ml	20 μl $5 \cdot 10^{-6}$ M	$5 \cdot 10^{-8}$ M

Tabulka 3 Vztah mezi koncentrací připraveného methylviologenu v roztoku a výslednou koncentrací methylviologenu v systému před přidavkem NaCl.

3.4. Příprava vzorků pro TEM

3.4.1. Příprava nosných povrchů

Při pouhlikování měděných sítěk byly nejprve měděné sítky ponořeny na 5 minut do kyseliny octové a pak promyty destilovanou vodou a acetonem. Po ponoření sítěk do kádinky s acetonem se kádinka vložila na 10 minut do ultrazvuku. Po deseti minutách byly sítky přeneseny na filtrační papír, aby se osušily.

Mezitím byla do připravené Petriho misky s vodou vložena slída s uhlíkovou folií na povrchu a přiložena k vodní hladině pod úhlem 30° . Po chvíli se slída začala zanořovat. Uhlíková folie se uvolnila a zůstala na hladině. Prázdnou slídu bylo třeba odstranit.

Očištěná mikroskopická síťka byla uchopena pinzetou a ponořena do vody mimo uhlíkovou folii. Následně byla síťka umístěna pod folii a při vynoření byla folie nabrána na síťku. Síťka byla osušena filtračním papírem a vložena do trezorku.

3.4.2. Nanášení hydrosolu Ag NČ na pouhlikované měděné sítky

Síťka byla uchycena do pinzety z trezorku. Pinzeta s uchycenou síťkou byla položena na Petriho misku tak, že špička pinzety se síťkou přesahovala přes okraj. Síťku je třeba umístit tak, aby pouhlikovaná vrstva byla nahoře. Následně byla na síťku nakápnuta pomocí 20 μl automatické pipety kapka hydrosolu Ag NČ. Je třeba postupovat velice opatrně, aby se kapka nedotkla pipety neboť by hydrosol Ag NČ mohl snadno zagregovat. Poté byla síťka

s nakápnutým hydrosolem Ag NČ přikryta víčkem Petriho misky. Kapka byla ponechána k zaschnutí 10 minut. Takto nanesená síťka byla vložena do trezoru.

3.5. Instrumentace

Spektra Ramanova rozptylu, tj. RS, RRS, SERS, SERRS byla měřena při konstantní teplotě 20 °C s využitím Ramanova spektrometru vybaveného Monospec 600 monochromátorem a CCD detektorem (Princeton Instruments), který byl chlazen kapalným dusíkem. Holografický filtr (Kaiser) byl umístěn před vstupní štěrbinou monochromátoru. Pro excitaci záření o vlnové délce 441,6 nm byl použit laser He - Cd laser (Liconix 4230N) a pro excitaci záření o vlnové délce 532 nm byl použit NdVO₄ (Coherm). Získaná spektra byla dále upravena v programech NeokalSpex 2 a Sp2Asc (MFF UK, Praha).

Spektra Ramanovy mikrospektroskopie byla měřena na konfokálním Ramanově mikrospektrometru LabRAM HR 800 (Horiba Jobin Yvon). Bylo použito excitačních vlnových délek 514,5 nm Ar⁺ laser (Melles Griot) a 632,8 nm He – Ne laser (Melles Griot).

UV/ Vis spektra neboli spektra plasmonové extinkce byla měřena na aparatuře Ocean Optics HR 4000. Od září 2011 byl použit modernější přístroj - jednokanálový Specord S300 (Analytik Jena). Tento přístroj byl vybrán, aby bylo možno realizovat dynamická měření UV/Vis spekter stejným způsobem jako měření SERS a SERRS spekter.

Snímky z TEM byly pořizovány, ve spolupráci s Oddělením elektronové mikroskopie Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd České republiky, na aparatuře JEOL – JEM 200CX.

3.6. Teorie faktorové analýzy

Faktorová analýza patří mezi vícerozměrné statistické metody používané pro zpracování a interpretaci rozsáhlých souborů dat. Tyto matematické metody našly široké uplatnění v mnoha oblastech výzkumu včetně zpracování spektroskopických dat. Často se označují souhrnným názvem chemometrie (chemometrics).

S rostoucí výkonností a dostupností počítačů se faktorová analýza začíná uplatňovat ve vibrační spektroskopii při analýze rozsáhlých souborů experimentálních dat.⁴⁴ Podstatou této metody je redukce souborů N experimentálních spekter $Y_i(\nu)$, $i=1,\dots,N$ na jejich nejmenší dimenzi M bez ztráty spektroskopické informace, například procedurou rozkladu do singulárních hodnot (SVD – Singular Value Decomposition).^{45,46} Každé z N naměřených spekter pak lze popsat vztahem:

$$Y_i(v) = \sum_{j=1}^N W_j V_{ij} S_j(v) \quad (3.1.)$$

kde W_j , $j=1, \dots, N$ jsou singulární hodnoty, $S_j(v)$, $j=1, \dots, N$ jednotlivá ortonormální subspektra a V_{ij} ($N \times N$) je čtvercová matice koeficientů, tj. relativních vah subspekter v jednotlivých experimentálních spektrech, přičemž platí:

$$\begin{aligned} \int S_j(v) S_k(v) dv &= 0 & \text{pro } j \neq k, & \quad \int S_j(v)^2 dv = 1 \\ \sum_{i=1}^N V_{ij} V_{ik} &= 0 & \text{pro } j \neq k, & \quad \sum_{i=1}^N V_{ij}^2 = 1 \end{aligned} \quad (3.2.)$$

Protože subspektra jsou ortonormalizována (viz rovnice 3.2.), jejich významnost charakterizuje velikost příslušné singulární hodnoty, podle které lze subspektra seřadit do klesající posloupnosti. Subspektra s nulovou nebo zanedbatelnou singulární hodnotou přinášení do lineární kombinace pouze nulový nebo zanedbatelný příspěvek a lze je vynechat. Pokud pro aproximaci experimentálních spekter $Y_i(v)$ použijeme pouze lineární kombinace M ($M < N$) nejvýznamnějších spekter, ztratí se pouze nepatrná část informace, často spojená se šumem:

$$Y'_i(v) = \sum_{j=1}^M W_j V_{ij} S_j(v) \quad (3.3.)$$

Minimální hodnota M , pro kterou se levá strana rovnice (3.3.) liší od experimentálního spektra pouze o nepodstatnou chybu, označujeme jako faktorovou dimenzi M . Faktorová dimenze tedy určuje minimální počet lineárně nezávislých složek, spektroskopicky rozlišených v analyzovaném souboru. Její určení je klíčovým bodem faktorové analýzy.

Pokud studujeme systém, ve kterém se sledovaná molekula může vyskytovat v několika (např. L) spektroskopicky odlišitelných formách, pak je zřejmé, že naměřená experimentální spektra musí být také superpozicí spekter $Z_n(v)$ čistých forem této látky podle vztahu:

$$Y_i(v) = \sum_{n=1}^L \gamma_{ni} Z_n(v) \quad (3.4.)$$

kde n je číslo čisté formy a γ_{ni} udává spektrální frakci n -té čisté formy v i -tém vzorku. Spektra $Z_n(v)$ čistých forem lze také vyjádřit jako lineární kombinací relevantních ortonormálních subspekter $S_j(v)$:

$$Z_n(v) = \sum_{j=1}^L C_{nj} S_j(v) \quad (3.5.)$$

kde C_{nj} jsou koeficienty transformační (často označované jako rotační) matice. Na základě rovnic (3.3.), (3.4.) a (3.5.) lze odvodit vztah mezi W_j , V_{ij} , C_{nj} a γ_{ni} :

$$\sum_{n=1}^L \gamma_{ni} C_{nj} = W_j V_{ij} \quad \text{pro } i=1 \dots N, j=1 \dots L \quad (3.6.)$$

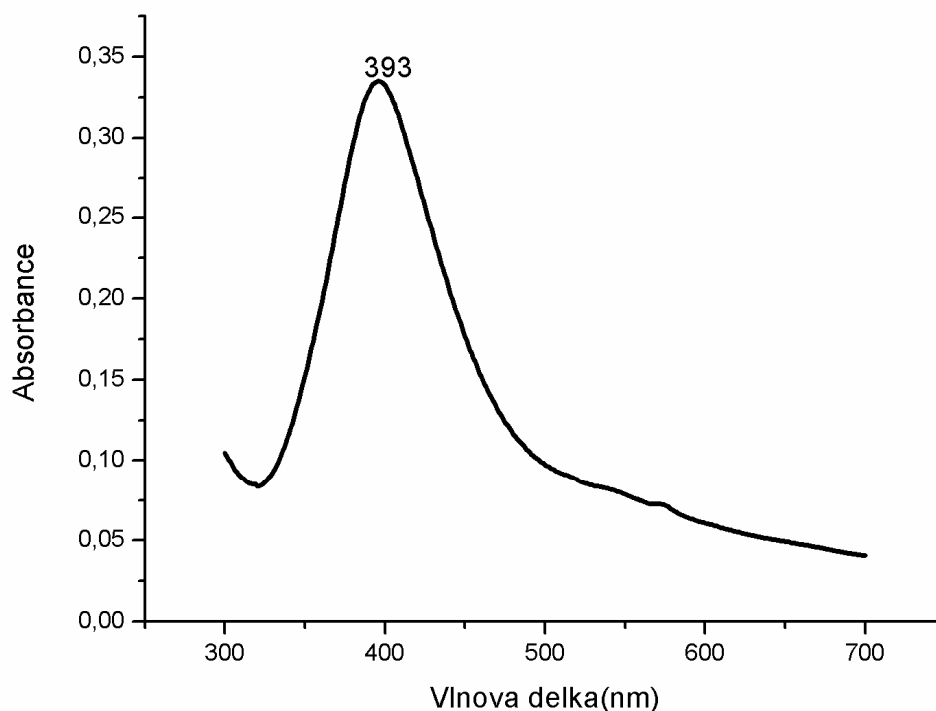
Získáme-li řešením soustavy rovnic (3.6.) koeficienty matice C_{nj} , můžeme z výsledků faktorové analýzy zkonstruovat spektra čistých forem Z_n podle rovnice (3.5.). V obecném případě existuje nekonečně mnoho řešení. Pokud jsou však spektrální frakce (relativní zastoupení) jednotlivých čistých forem vzájemně propojeny nějakými omezujícími vztahy (rovnice chemické rovnováhy, kinetické rovnice, apod.), jedná se o přeurčený systém rovnic a řešení lze získat fitovacími metodami. I v případě, že to není možné, jsou výsledky faktorové analýzy velice užitečné pro pochopení procesů, které ve studovaném systému probíhají, protože dovolují (bez apriorních znalostí) určit počet lineárně nezávislých, spektrálně odlišitelných forem a jednoduchým způsobem nahlédnout, v čem tyto spektrální rozdíly spočívají a jak jsou významné.⁴⁷

4. Výsledky a diskuze

4.1. Spektrální charakteristiky výchozího hydrosolu Ag NČ a ZnTMPyP

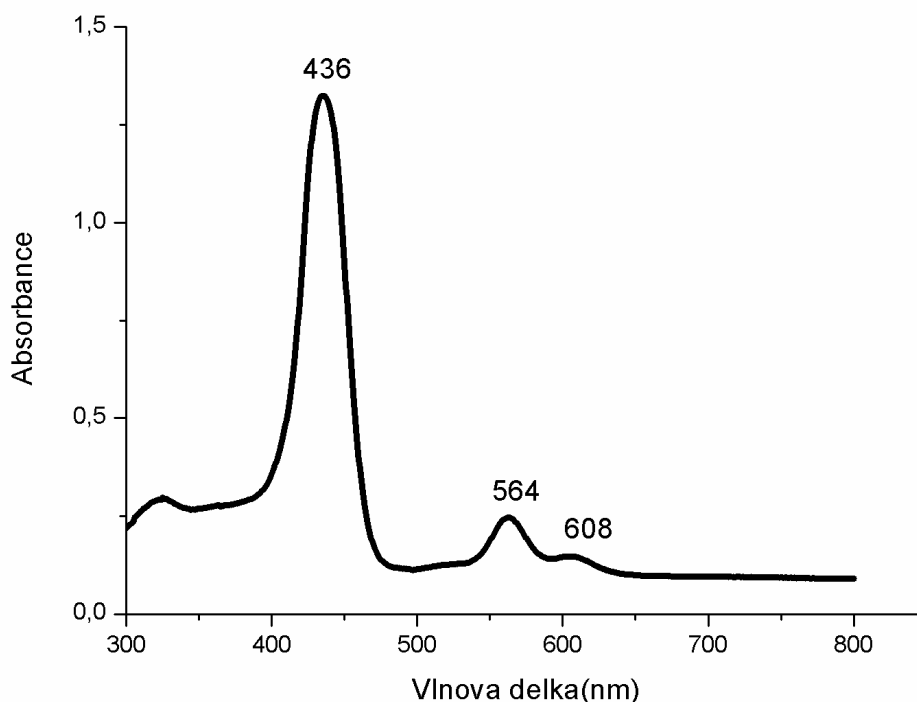
První cílem při experimentech bylo změření elektronových absorpčních spekter ZnTMPyP a SPE spekter hydrosolu Ag NČ. SPE spektrum hydrosolu Ag NČ ukazuje obrázek 2. Poměrně úzký, jen mírně asymetrický pás s maximem 393 nm, naznačuje přítomnost izolovaných Ag NČ. SPE spektrum je ve shodě s velikostí Ag NČ uvedených v ref. 48. Dle tohoto SPE spektra je možno usuzovat na shodu s morfologiemi uvedenými v ref 7. Dle této reference je průměrná velikost izolovaných Ag NČ 9 – 10 nm.

Kromě elektronových absorpčních spekter ZnTMPyP byla změřena i spektra RRS při excitační vlnové délce $\lambda = 441,6$ nm a $\lambda = 532$ nm – viz kapitola 4.5..



Obrázek 2 SPE spektrum hydrosolu Ag NČ.

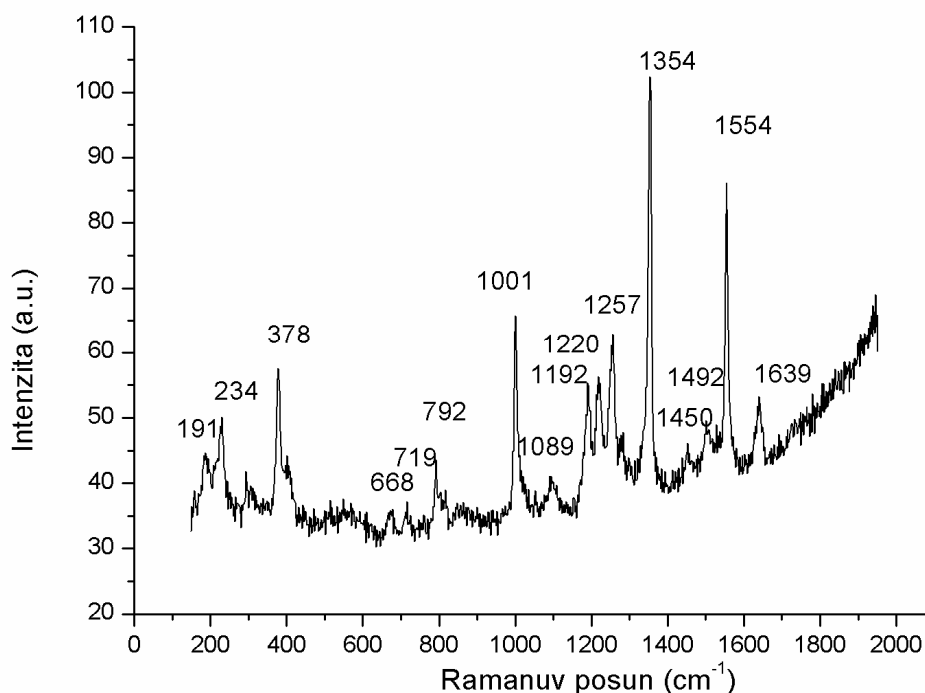
Získané SPE spektrum ukazuje shodu s SP – viz kapitola 1.2.1..



Obrázek 3 Elektronové absorpční spektrum vodného roztoku ZnTMPyP o koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ M.

V elektronovém absorpčním spektru ZnTMPyP je pozorován Soretův pás při $\lambda=436$ nm a dva Q-pásy při vlnových délkách $\lambda= 564$ nm a 608 nm. Tyto údaje jsou důležité pro další měření spekter Ramanova rozptylu, poněvadž ukazují oblasti vlnových délek, při nichž v Ramanovu, respektive SERS spektru přispívá molekulární rezonance. Toto elektronové absorpční spektrum je ve shodě s údaji publikovanými Hikalem *et. al.*⁴⁹

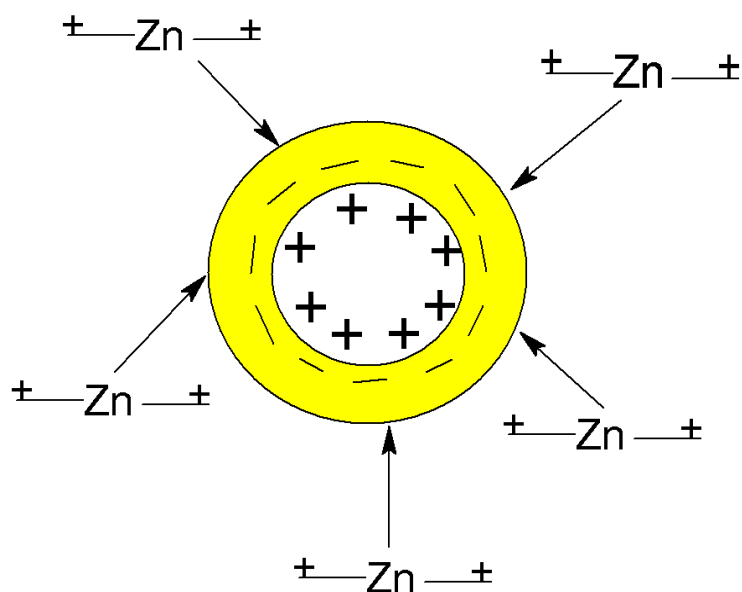
Metodou Ramanovy mikrospektroskopie byla získána Ramanova spektra ZnTMPyP. Změřené spektrum odpovídá spektru změřenému v práci Bloma *et. al.*⁵⁰ Vibrační pásy odpovídající charakteristickým pásům metaloporfyrinů jsou 379, 1353, 1554 cm^{-1} . Pro tento zinkový porfyrin jsou pak charakteristické vibrační pásy 1192, 1220, 1554 a 1640 cm^{-1} .



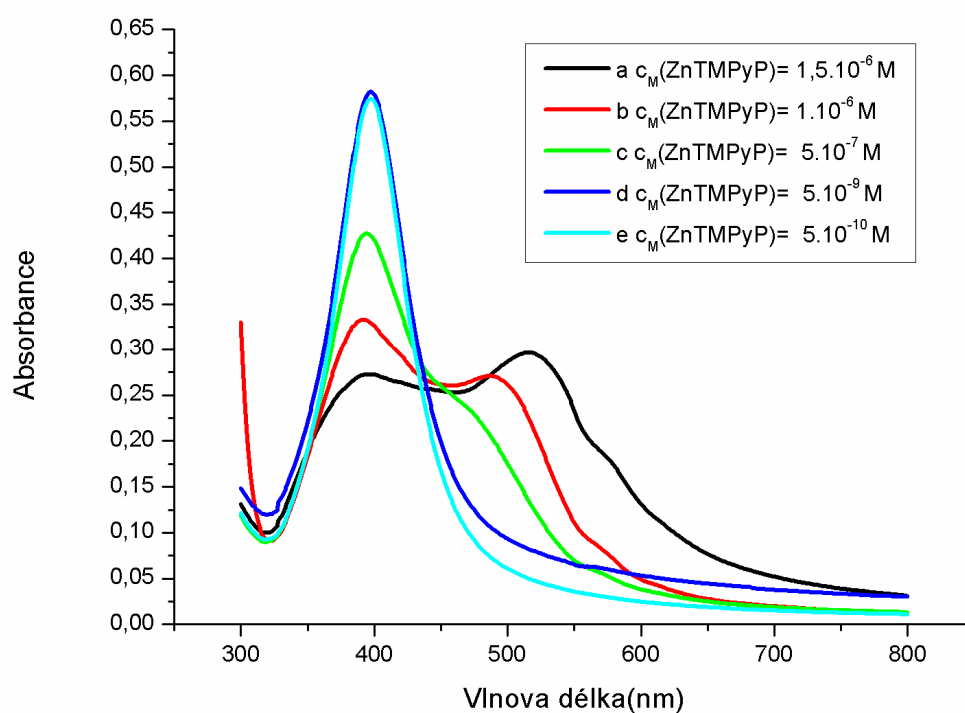
Obrázek 4 Spektrum krystalického ZnTMPyP pořízené pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. Excitační vlnová délka $\lambda = 514,5$ nm.

4.2. Agregace Ag NČ v systémech hydrosol Ag NČ a ZnTMPyP v závislosti na koncentraci porfyrinu

Dalšími měřeními bylo zjištěno při jaké koncentraci ZnTMPyP v systémech s hydrosolem Ag NČ dochází k agregaci na Ag NČ v důsledku adsorpce ZnTMPyP. Bylo zjištěno, že v případě že je koncentrace ZnTMPyP vyšší nebo rovna $c_M = 5 \cdot 10^{-7}$ M dochází k agregaci Ag NČ v systému, jak se projevuje na obrázku 6 A, B, C, D. Při nižší koncentraci ZnTMPyP již k agregaci na Ag NČ nedochází. Schematické znázornění elektrostatické interakce mezi elektrickou dvojvrstvou na povrchu Ag NČ a kationovým porfyrinem ZnTMPyP je uvedeno na obrázku 5.



Obrázek 5 Znázornění elektrostatické interakce mezi elektrickou dvojvrstvou na povrchu Ag NČ a kationovým porfyrinem ZnTMPyP .



Obrázek 6 SPE spektra systémů hydrosol Ag NČ/ZnTMPyP v závislosti na koncentraci ZnTMPyP v systému.

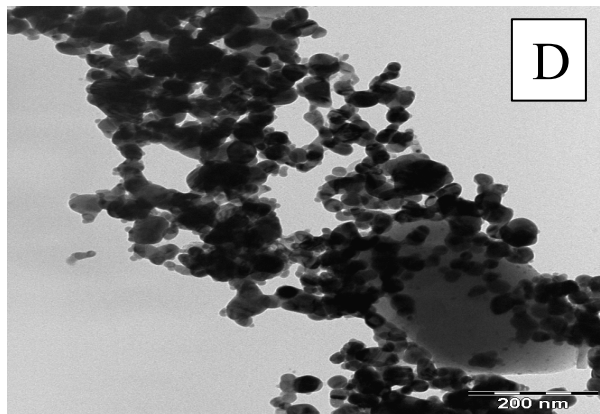
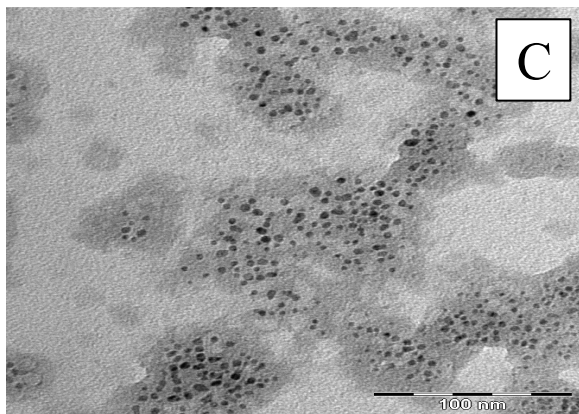
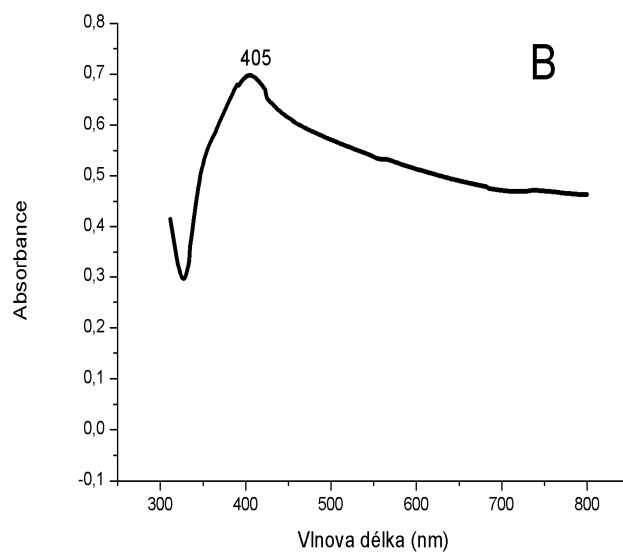
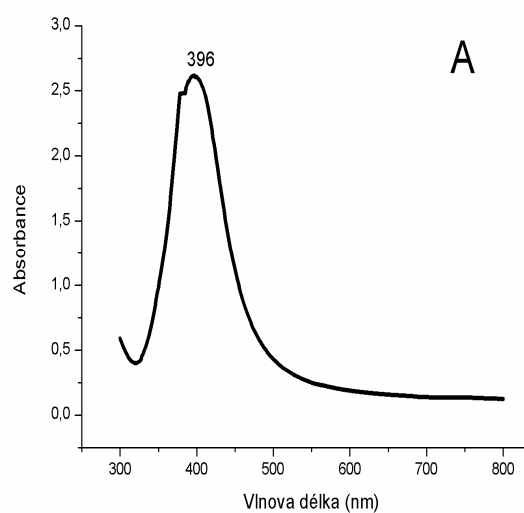
4.3. Spektrální a morfologické charakteristiky systémů Ag NČ/ ZnTMPyP a Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl

SPE spektrum systému a TEM snímek Ag NČ/ ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-7}$ M) (obrázek 7 A a C) shodně prokazují přítomnost izolovaných (tj. neagregovaných) Ag NČ. Dalším úkolem bylo zjistit, zda přidavkem vodného roztoku NaCl (100 μ l 1 M) k tomuto systému lze uskutečnit konverzi izolovaných nanočástic na jejich kompaktní agregáty. SPE spektrum a TEM snímek systému Ag NČ/ZnTMPyP ($c_M= 5 \cdot 10^{-7}$ M)/NaCl (obrázek 7 B a D) jsou ve shodě s dříve publikovanými výsledky Šloufové *et. al.*²⁴ a ukazují na přítomnost kompaktních agregátů v systému. Tyto výsledky (obrázek 7 A-D) dokumentují, že se podařilo připravit dva různé systémy, v nichž je shodné látkového množství ZnTMPyP adsorbovaného jednak na izolované nanočástice, čímž vzniká systém bez „hot spots“ (po optické excitaci), a jednak včleněno do kompaktních agregátů po přidavku NaCl, čímž vzniká systém obsahující „hot spots“.

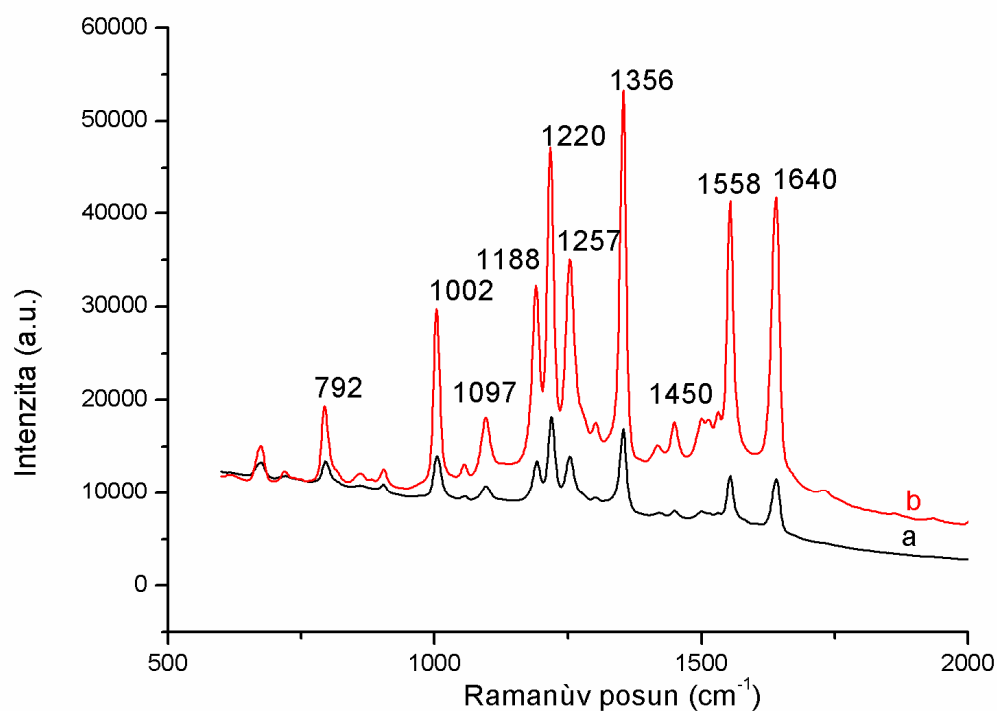
Dalším úkolem studie bylo tedy srovnání SERSS a SERRS spekter ZnTMPyP v systémech izolovanými Ag NČ a kompaktními agregáty Ag NČ v závislosti na koncentraci ZnTMPyP v systémech.

4.4 SERS/ SERRS spektra systémů hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP a hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl

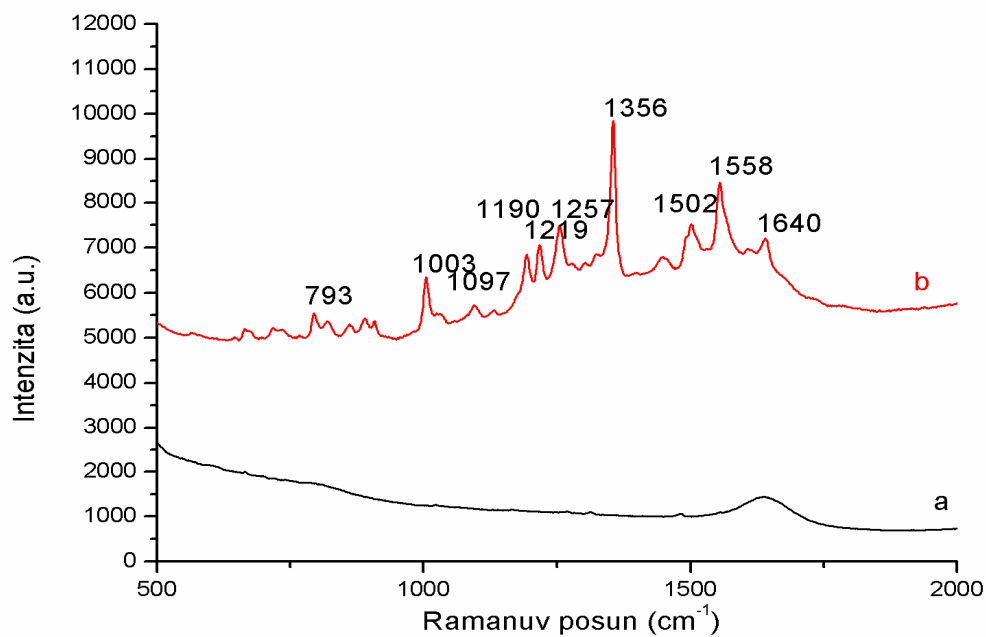
Na obrázcích 8 a 9 lze vidět znatelný nárůst SERS a SERRS signálu ZnTMPyP u systému s chloridovými anionty při excitaci 441,6 nm a 532 nm. Tento nárůst signálu lze vysvětlit tvorbou kompaktních agregátů s „hot spots“ po optické excitaci. Dalším výsledkem této studie je, že vibrační pásy charakteristické po ZnTMPyP jsou shodné s obrázkem 4. Toto značí, že centrální atom zinku není v ZnTMPyP zaměňován za stříbro. U těchto systémů rovněž byla proměřena koncentrační závislost.



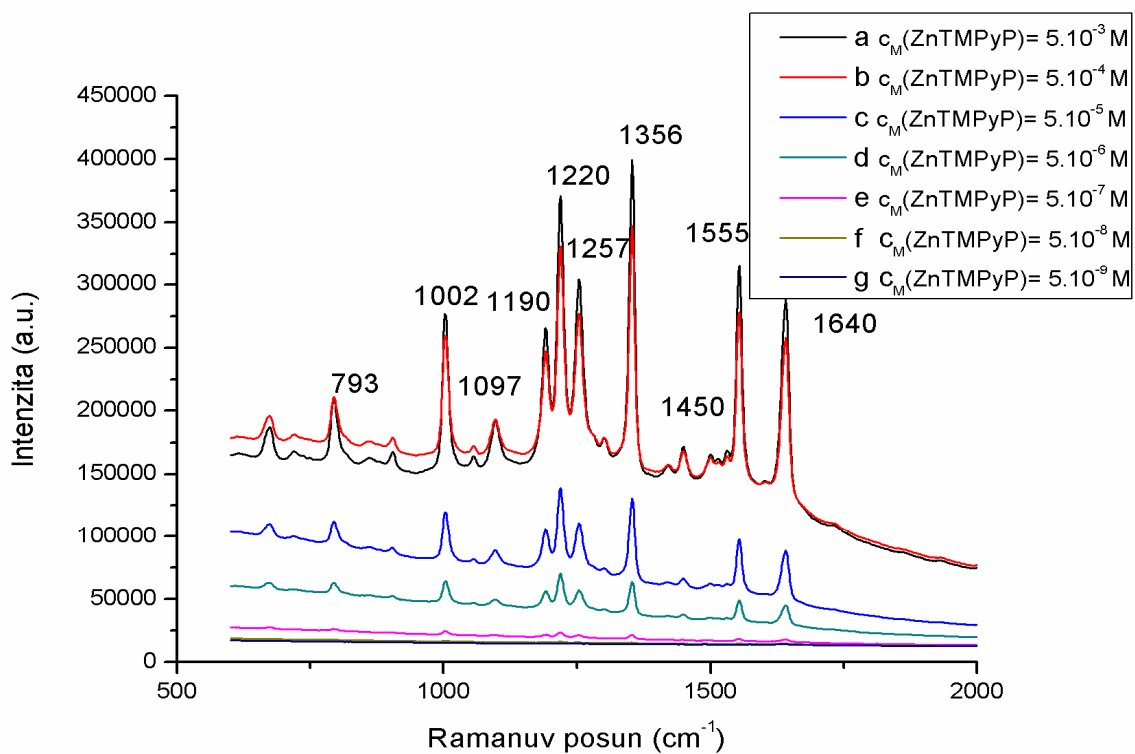
Obrázek 7 SPE spektra (A,B) a TEM snímky (C,D) systémů Ag NČ/ ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-7}$ M (A,C) a Ag NČ/ ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-7}$ M)/NaCl (B,D).



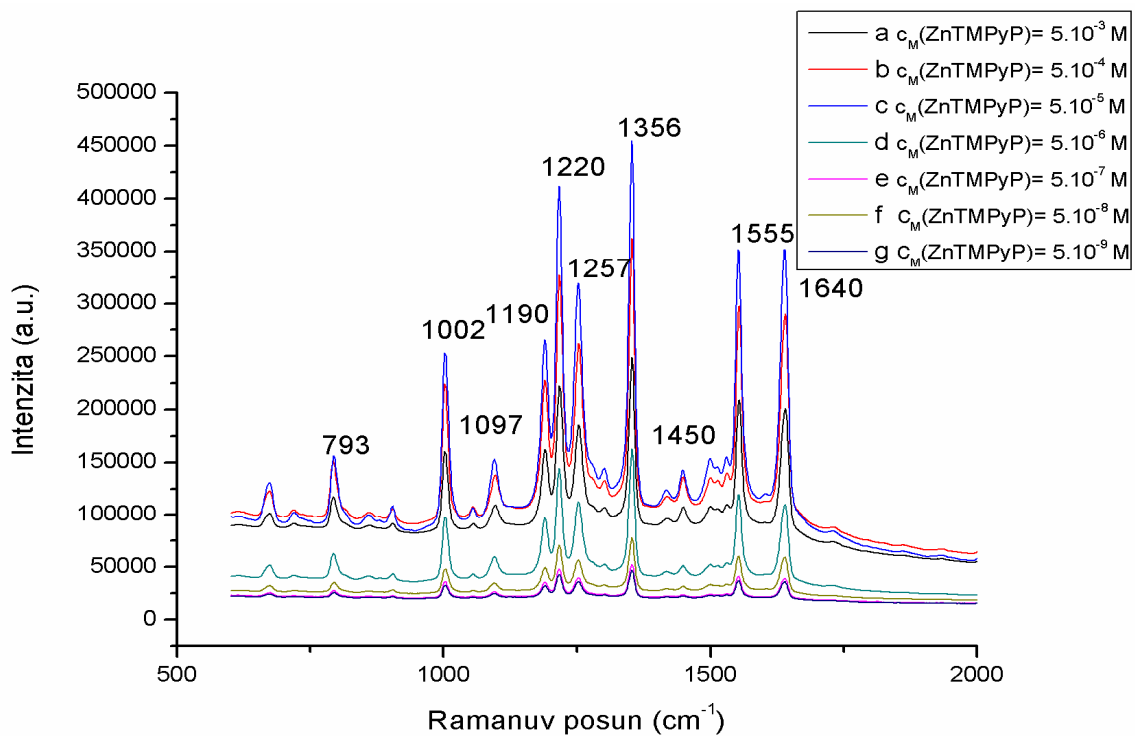
Obrázek 8 Srovnání SERS spekter systémů Ag NČ/ ZnTMPyP(a) a Ag NČ/ ZnTMPyP /NaCl (b) při shodné koncentraci ZnTMPyP $c_M=5 \cdot 10^{-7}$. Excitační vlnová délka $\lambda=441,6$ nm.



Obrázek 9 Srovnání SERS spekter systémů Ag NČ/ ZnTMPyP(a) a Ag NČ/ ZnTMPyP /NaCl (b) při shodné koncentraci ZnTMPyP $c_M=5 \cdot 10^{-7}$. Excitační vlnová délka $\lambda=532$ nm.

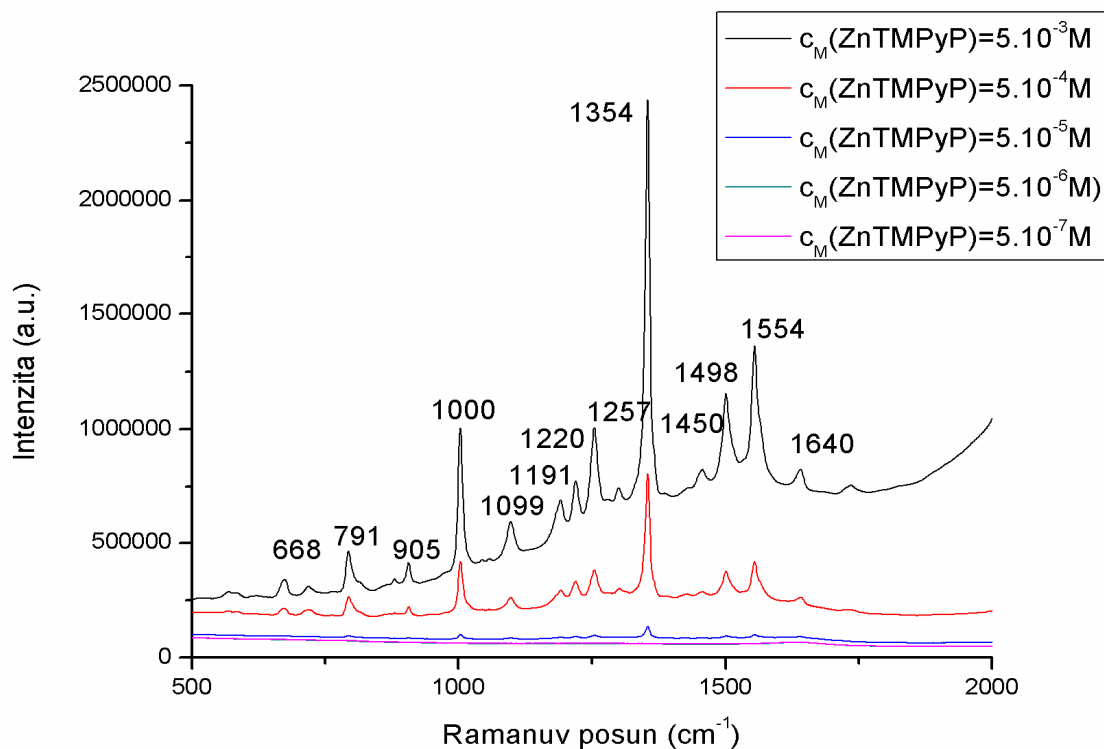


Obrázek 10 Srovnání SERS spekter systémů Ag NČ/ ZnTMPyP v závislosti na koncentraci ZnTMPyP. Excitační vlnová délka 441,6 nm.

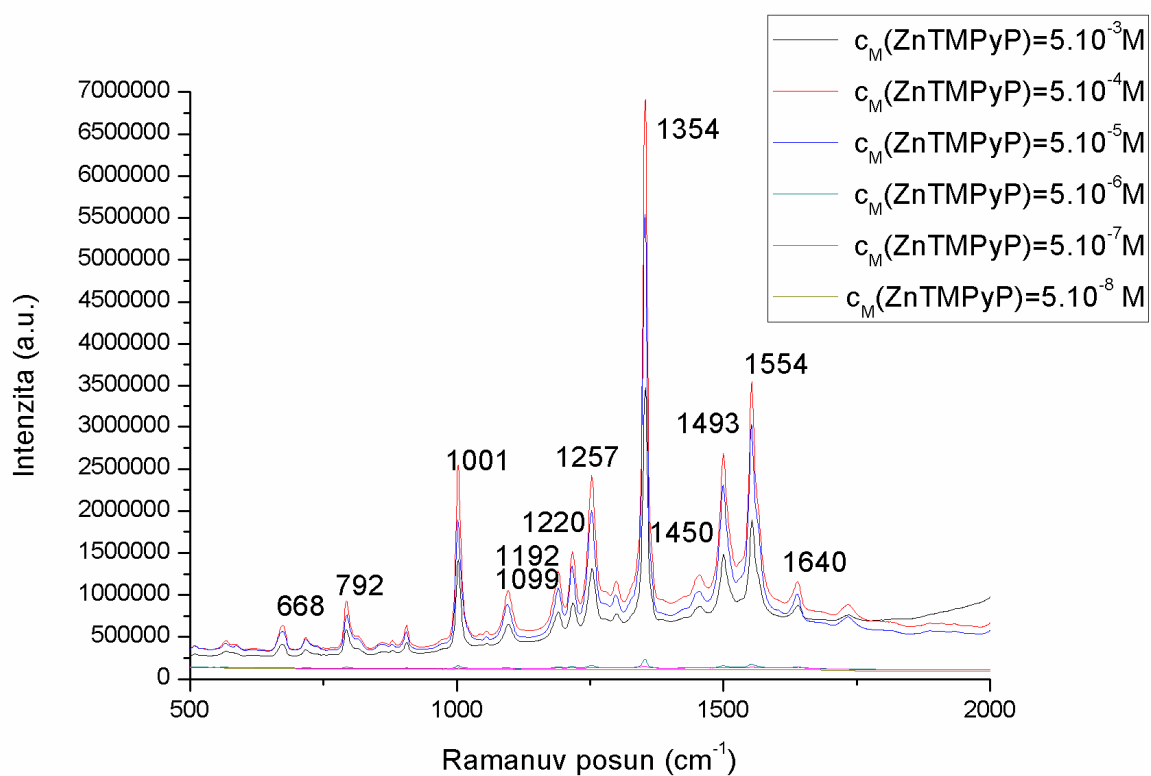


Obrázek 11 Srovnání SERS spekter systémů Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl v závislosti na koncentraci ZnTMPyP. Excitační vlnová délka 441,6 nm.

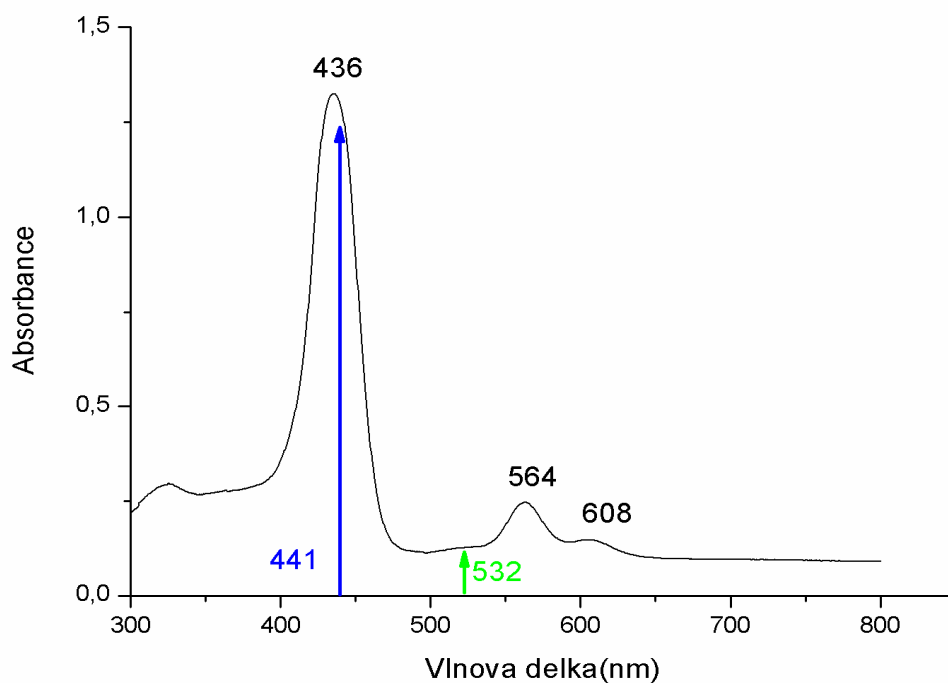
Ze závislostí SERRS spektra ZnTMPyP na jeho koncentraci na obrázcích 10 a 11 je možno stanovit mez SERRS spektrální detekce ZnTMPyP pro systémy Ag NČ/ ZnTMPyP a Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl pro excitační vlnovou délku 441, 6 nm. U systémů Ag NČ/ ZnTMPyP je mez SERRS spektrální detekce $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-7}$ M. U systému Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl dochází ke snížení meze SERRS spektrální detekce o dva řády na koncentraci $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-9}$ M.



Obrázek 12 Srovnání SERS spekter systémů Ag NČ/ ZnTMPyP v závislosti na koncentraci ZnTMPyP. Excitační vlnová délka 532 nm.



Obrázek 13 Srovnání SERS spekter systémů Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl v závislosti na koncentraci ZnTMPyP. Excitační vlnová délka 532 nm.

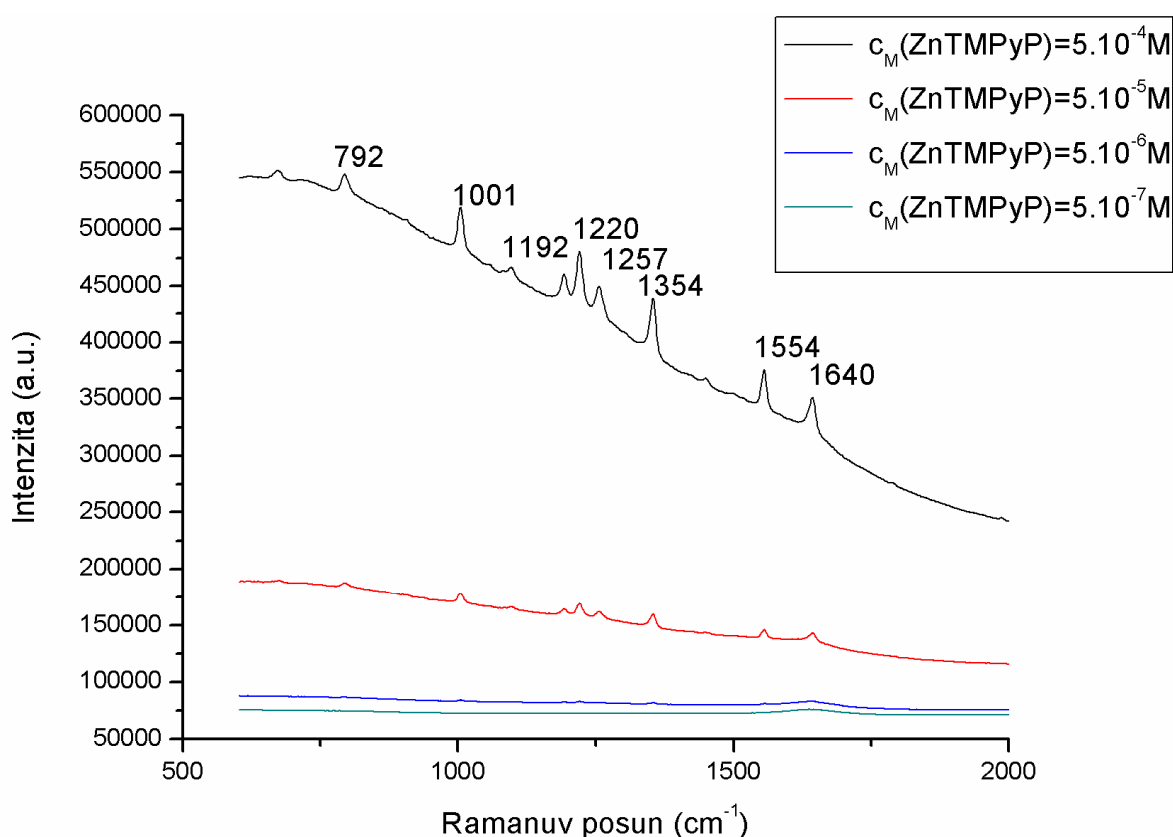


Obrázek 14 Průmět použitých λ_{exc} do elektronového absorpčního spektra ZnTMPyP o koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ M.

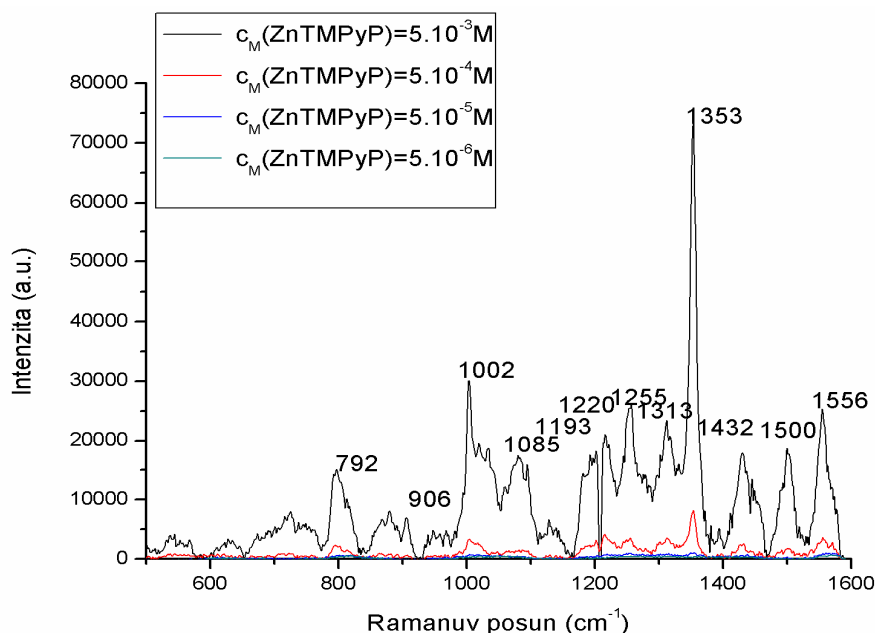
Ze závislosti SERS spektra ZnTMPyP na jeho koncentraci na obrázcích 12 a 13 je možno stanovit meze SERS spektrální detekce pro systémy Ag NČ/ ZnTMPyP a Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl pro excitační vlnovou délku 532 nm. U systémů Ag NČ/ ZnTMPyP je mez SERS spektrální detekce pro koncentraci $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-5}$ M. U systému AgNČ/ ZnTMPyP/ NaCl dochází ke snížení mez SERS spektrální detekce o jeden řád na $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-6}$ M.

4.5. Rezonanční Ramanův rozptyl ZnTMPyP

Dalším úkolem bylo stanovení meze detekce RRS ZnTMPyP za použití excitačních vlnových délek 441,6 nm a 532 nm. Pro excitační vlnovou délku 441,6 byla stanovena mez detekce $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-5}$ M (viz obrázek 15). Při stanovení meze detekce RRS ZnTMPyP za použití excitační vlnové délky 532 nm docházelo k výrazné fluorescenci ZnTMPyP. Proto bylo nutné použití programu Matlab ke korekci pozadí. Mez detekce RRS pro excitační vlnovou délku 532 nm byla stanovena na $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-4}$ M (viz obrázek 16).



Obrázek 15 RRS ZnTMPyP v závislosti na koncentraci ZnTMPyP. Excitační vlnová délka 441, 6 nm.



Obrázek 16 RRS ZnTMPyP v závislosti na koncentraci ZnTMPyP. Excitační vlnová délka 532 nm.

4.6. Porovnání mezi SER(R)S a (R)RS spektrální detekce ZnTMPyP

V tabulce 4 jsou shrnuty experimentálně zjištěné SER(R)S a (R)RS spektrální detekce pro vlnové délky 441,6 nm a 532 nm.

λ_{exc} (nm)	RRS $c_M(\text{ZnTMPyP})$	Ag NČ/ $c_M(\text{ZnTMPyP})$	Ag NČ/ $c_M(\text{ZnTMPyP})/\text{NaCl}$
441,6	$5 \cdot 10^{-5}$ M	$5 \cdot 10^{-7}$ M	$5 \cdot 10^{-9}$ M
532	$5 \cdot 10^{-4}$ M	$5 \cdot 10^{-5}$ M	$5 \cdot 10^{-6}$ M

Tabulka 4 Porovnání mezi SER(R)S a (R)RS spektrální detekce ZnTMPyP.

Pokles (R)RS meze spektrální detekce o jeden řád ukazuje na nárůst rezonačního zesílení při změně excitační vlnové délky z 532 nm na 441,6 nm. Tento nárůst signálu lze vysvětlit tím, že excitační vlnová délka koinciduje se Soretovým pásem ZnTMPyP s maximem 436 nm, zatímco excitační vlnová délka 532 nm spadá pouze do úpatí Q- pásu. Nárůst zesílení SER(R)S při změně excitační vlnové délky 532 nm na 441,6 nm se v projevuje v SER(R)S aktivních systémech Ag NČ/ ZnTMPyP i v Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl.

V systému Ag NČ/ ZnTMPyP se na nárůstu signálu při změně excitační vlnové délky 532 nm na 441,6 nm o 2 řády podílí jak EM mechanismus, tak mechanismus molekulární rezonance. Toto lze dokumentovat tím, že absorpční koeficient ϵ v elektronových absorpčních spektrech ZnTMPyP při excitační vlnové délce 441,6 nm je výrazně větší než u excitační vlnové délky 532 nm, což dokazuje obrázek 14. Rovněž plasmonové extinkce

isolovaných Ag NČ jsou výrazně větší v případě systémů Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl. O podílu EM mechanismu a molekulární rezonance na pozorovaném nárůstu signálu rozhodnout nelze. K tomuto účelu by bylo nutné srovnání s mezemi SERS spektrální detekce referentního kationtového nechromoforového adsorbátu v obou systémech a při obou excitačních vlnových délkách.

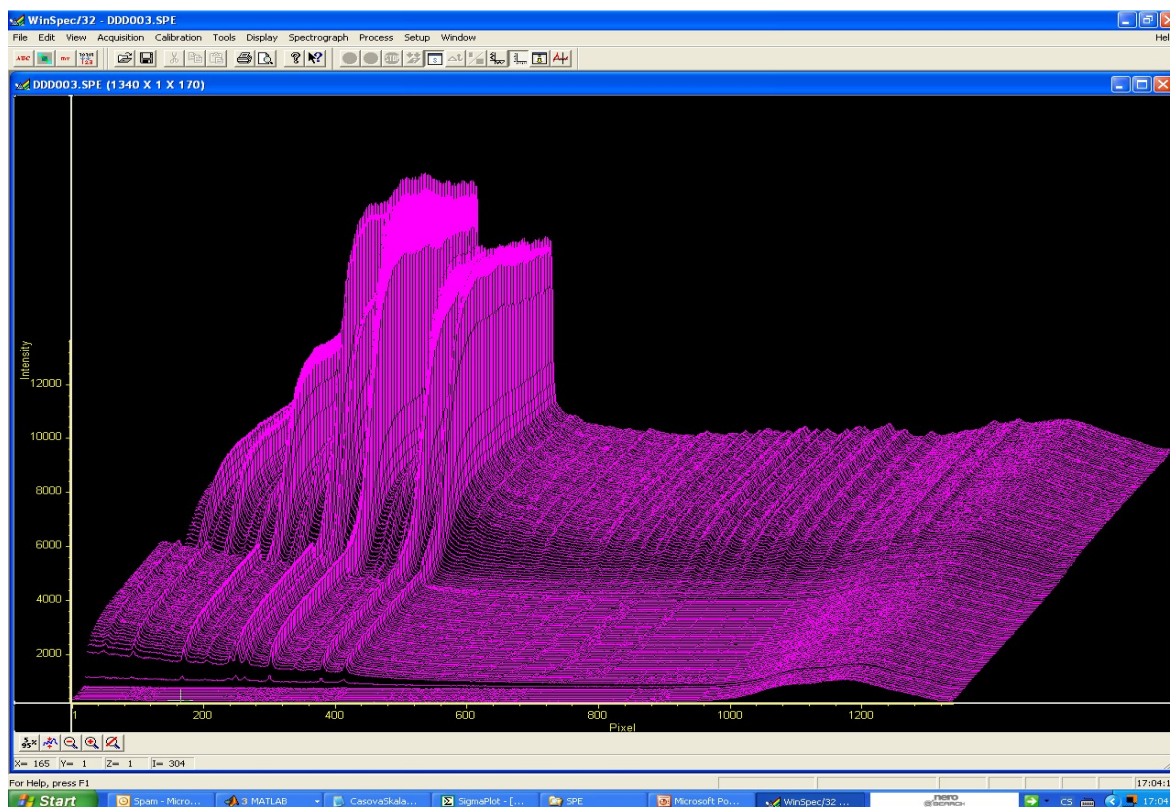
Pokles meze jak SERRS, tak i SERS spektrální detekce a odpovídající nárůst zesílení signálu při konverzi izolovaných nanočástic na kompaktní agregáty je pozorován jak při excitační vlnové délce 441,6 nm, tak i při excitační vlnové délce 532 nm a je vysvětlen lokalizací ZnTMPyP do „hot spots“ excitovaných v kompaktních agregátech.

4.7. SERS/ SERRS spektra systémů hydrosol Ag NČ, hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP, hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl – excitační vlnová délka 441,6 nm – dynamické měření

Při dynamických měřeních bylo postupováno v souladu s kapitolou 3.3 a obrázkem 1. Nejprve byl proměřen 40 sekund hydrosol Ag NČ, ke kterému bylo pipetou přidáno 20 μ l ZnTMPyP. Po dalších 240 sekundách byl pipetou do systému přidán NaCl. Celý experiment trval 680 sekund. Na obrázcích 19 – 22 je na ose x zaznamenáno pořadové číslo spektra. Pro jejich interpretaci na časové škále je nutné uvážit, že akumulace trvala 2 s a expozice také trvala 2s. Z tohoto důvodu je nutné hodnoty na ose x vynásobit čtyřmi, aby byla získána informace o čase v sekundách. Např. na obrázku 19 je možno pozorovat nárůst signálu v bodě 10 na ose x, po vynásobení 4, se získá hodnota 40, což je též i čas, ve kterém byl do systému pipetován ZnTMPyP

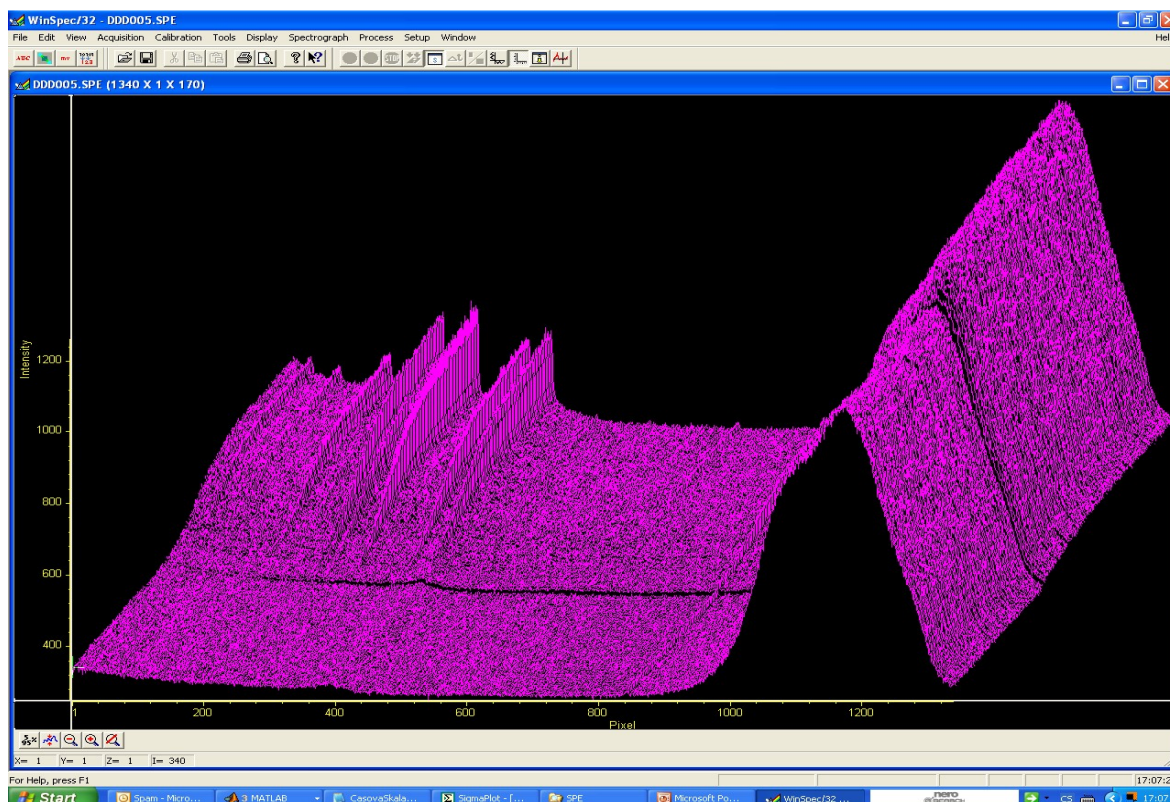
4.7.1. Průběh experimentu

Obrázek 17 ukazuje záznam z CCD detektoru při měření systému hydrosol Ag/ ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-6}$ M)/ NaCl. Na záznamu lze jednoznačně vidět, že po přidání ZnTMPyP k hydrosolu Ag NČ se na detektoru objeví vibrační pásy charakteristické pro ZnTMPyP. Po přidavku NaCl dochází k výraznému navýšení signálu.



Obrázek 17 Záznam z CCD detektoru při měření systému Ag/ ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-6}$ M) /NaCl.

Obrázek 18 ukazuje systém Ag/ ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-8}$ M)/ NaCl a jeho záznam z CCD detektoru. Lze pozorovat, že při přidání ZnTMPyP do systému nedochází k objevení charakteristických pásů pro ZnTMPyP. Tyto pásy jsou zřetelné až po přidání NaCl do systému. U této koncentrace ZnTMPyP v systému dochází k nárůstu pásu vody po přidání NaCl. U systému o vyšší koncentraci ZnTMPyP tento efekt není pozorován.

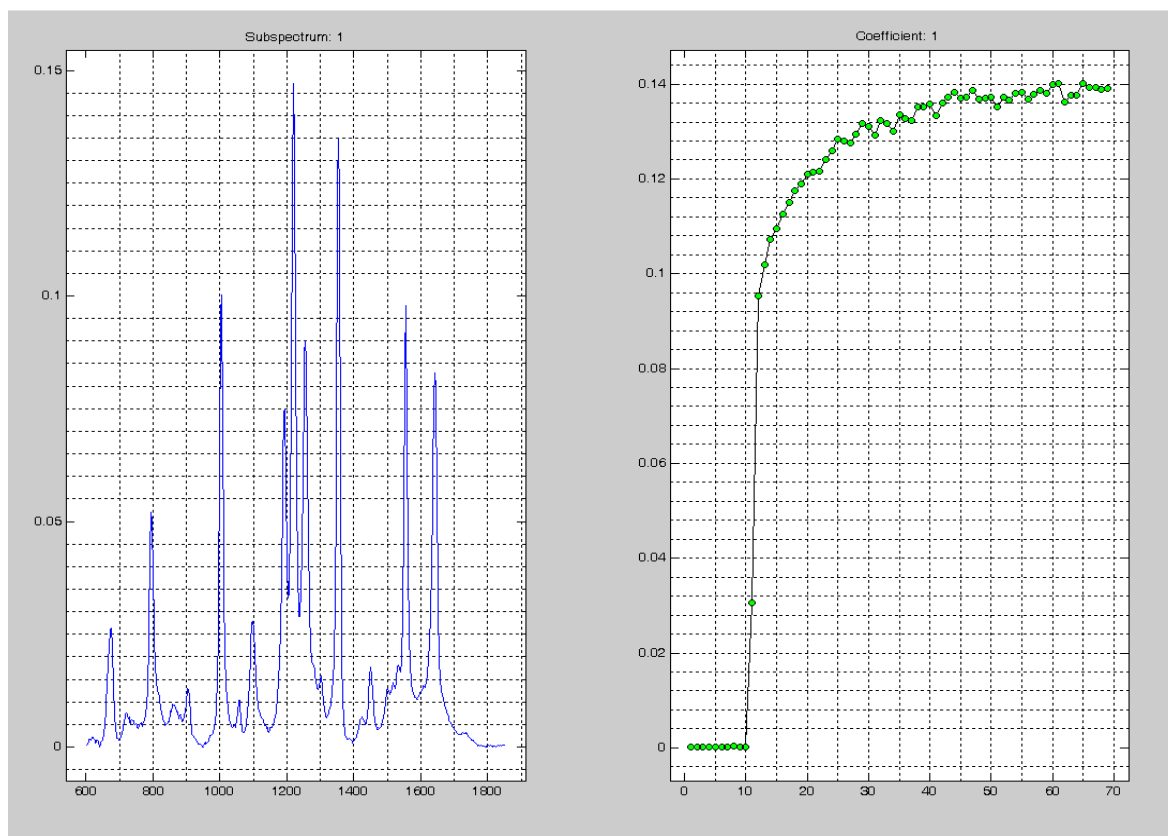


Obrázek 18 Záznam z CCD detektoru při měření systému Ag/ ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-8}$ M) /NaCl

4.7.2. Faktorová analýza

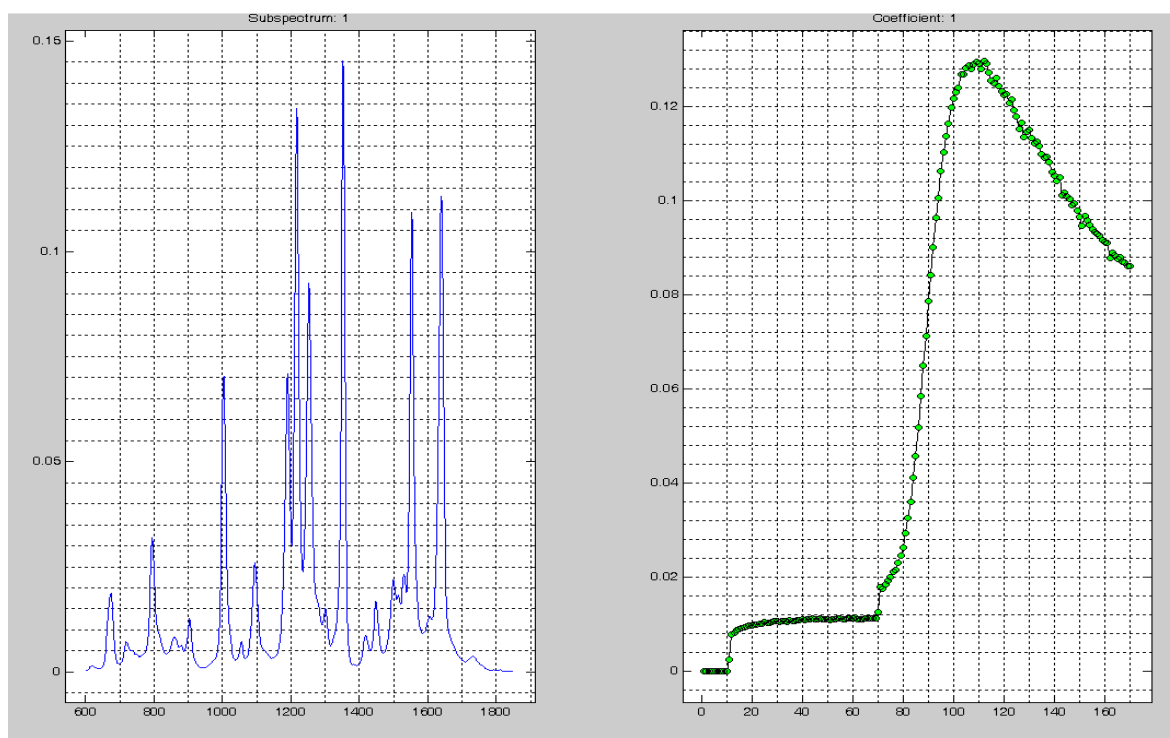
Nejprve bylo potřeba všechna spektra normalizovat na vnitřní standard a upravit tak, aby měla identický průběh pozadí (background). Z relativních velikostí singulárních hodnot plyne, že všechny spektrální změny pozorované v průběhu časového vývoje lze popsat prvními dvěma subspektry (viz obrázky 20, 21). Třetí spektrální komponenta je sice statisticky podstatně méně významná, přesto reálná a odráží některé změny ve spektrech ZnTMPyP při tvorbě „hot spots“ (obrázek 22).

Na obrázku 19 je možno pozorovat systém hydrosol Ag/ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-6}$ M). V subspektru S1 lze pozorovat charakteristické pásy ZnTMPyP a koeficient V_{i1} zobrazuje nárůst signálu po přidavku ZnTMPyP do systému.

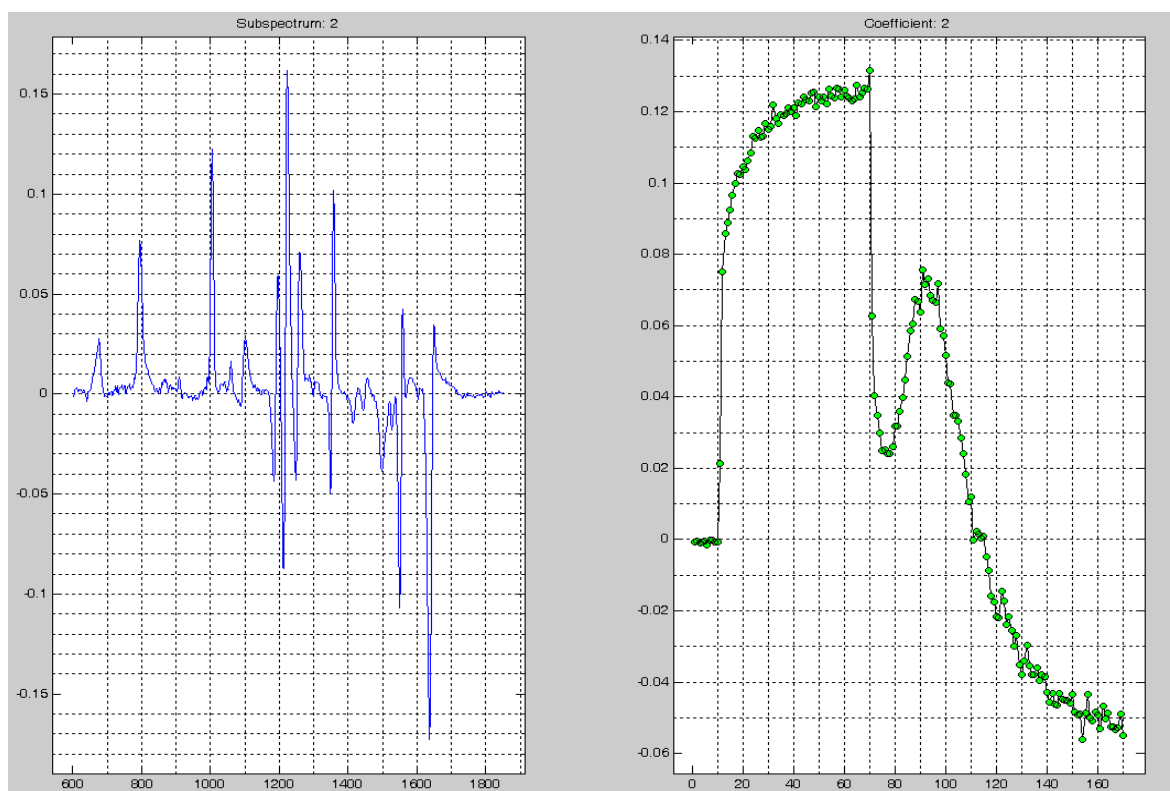


Obrázek 19 Vývoj systému hydrosol Ag/ ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-6}$ M) do okamžiku přidání NaCl.

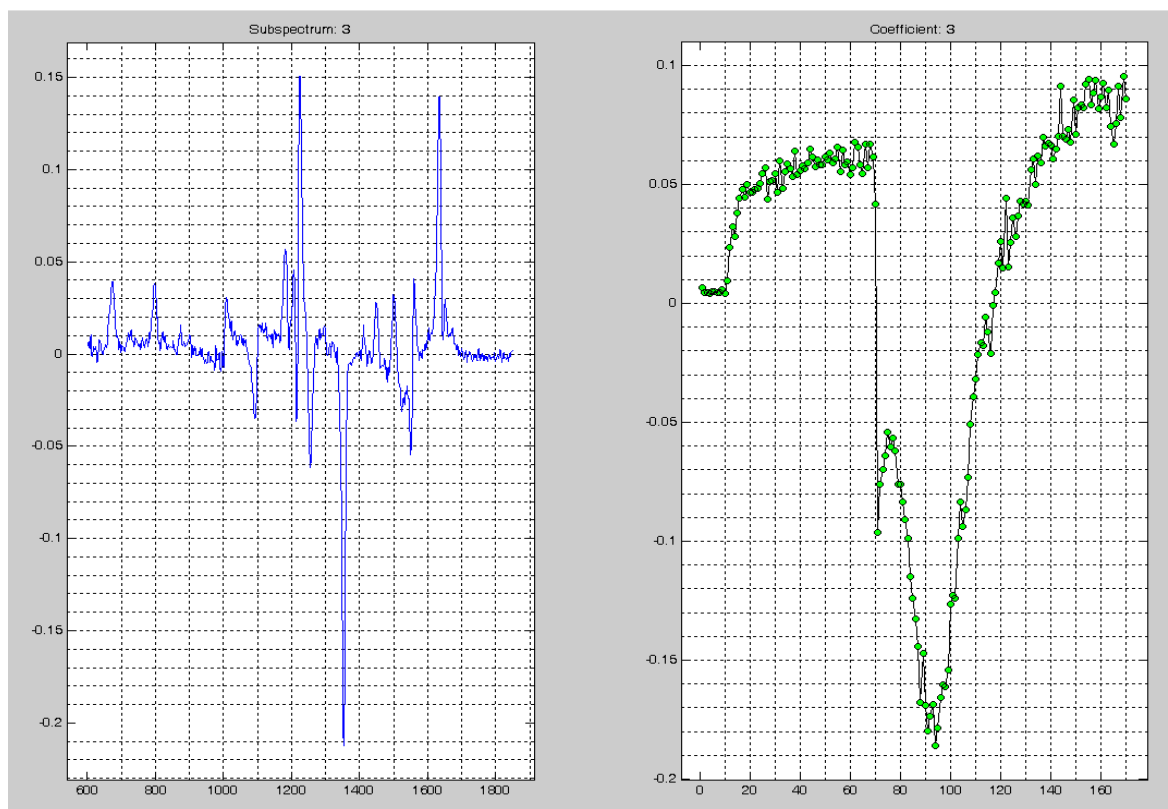
Tento systém byl podroben analýze i po přidavku NaCl (obrázek 20,21, 22). Lze pozorovat další výrazný nárůst signálu a následný pokles signálu. Přidáním chloridu sodného dochází k vzniku kompaktních agregátů a tím ke vzniku „hot spots“ po optické excitaci, což potvrzují i změny v průběhu SPE.



Obrázek 20 Vývoj systému hydrosol Ag → hydrosol Ag/ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-6}$ M) → hydrosol Ag/ ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-6}$ M)/NaCl, první spektrální komponenta.

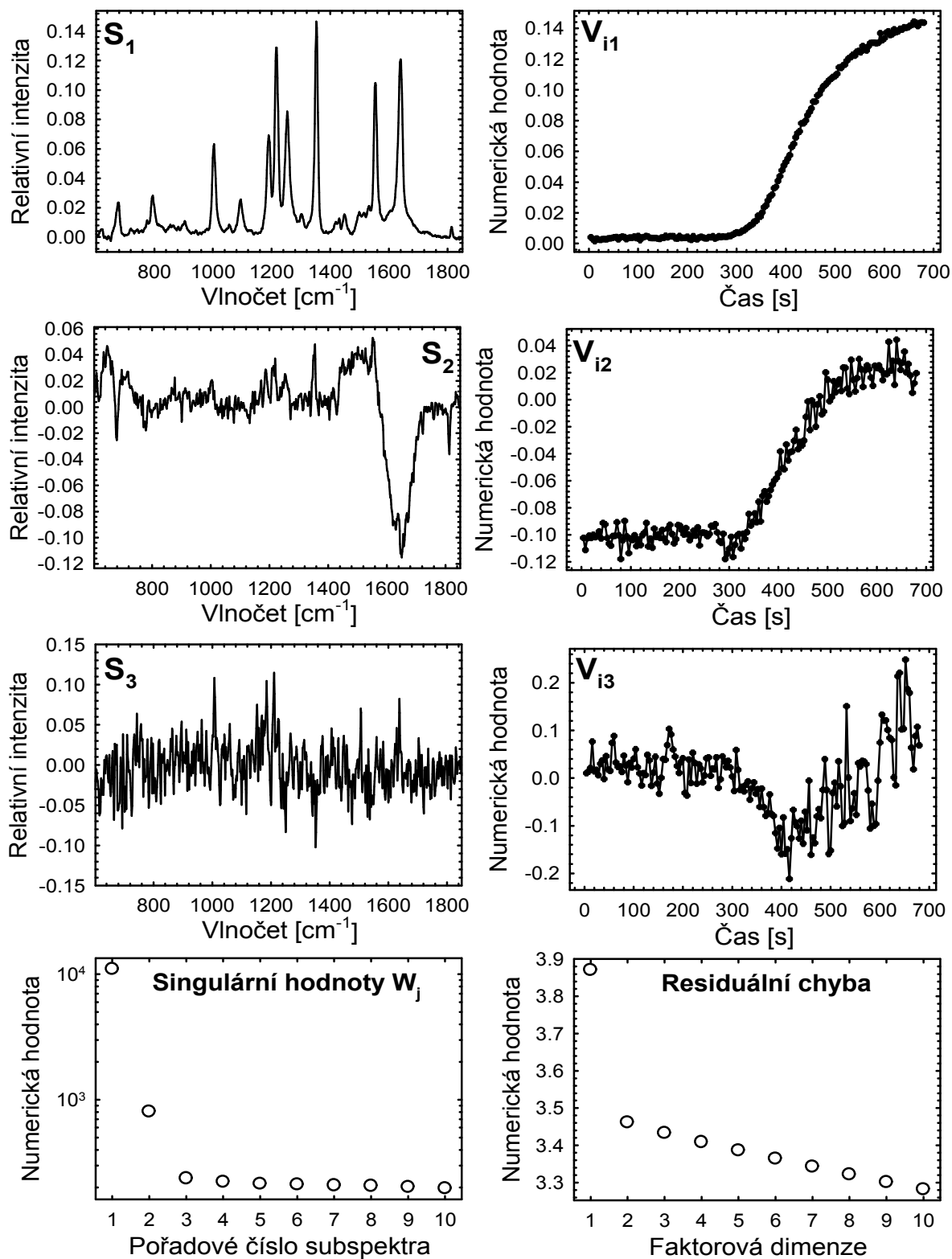


Obrázek 21 Vývoj systému hydrosol Ag → hydrosol Ag/ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-6}$ M) → hydrosol Ag/ ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-6}$ M)/NaCl, druhá spektrální komponenta.

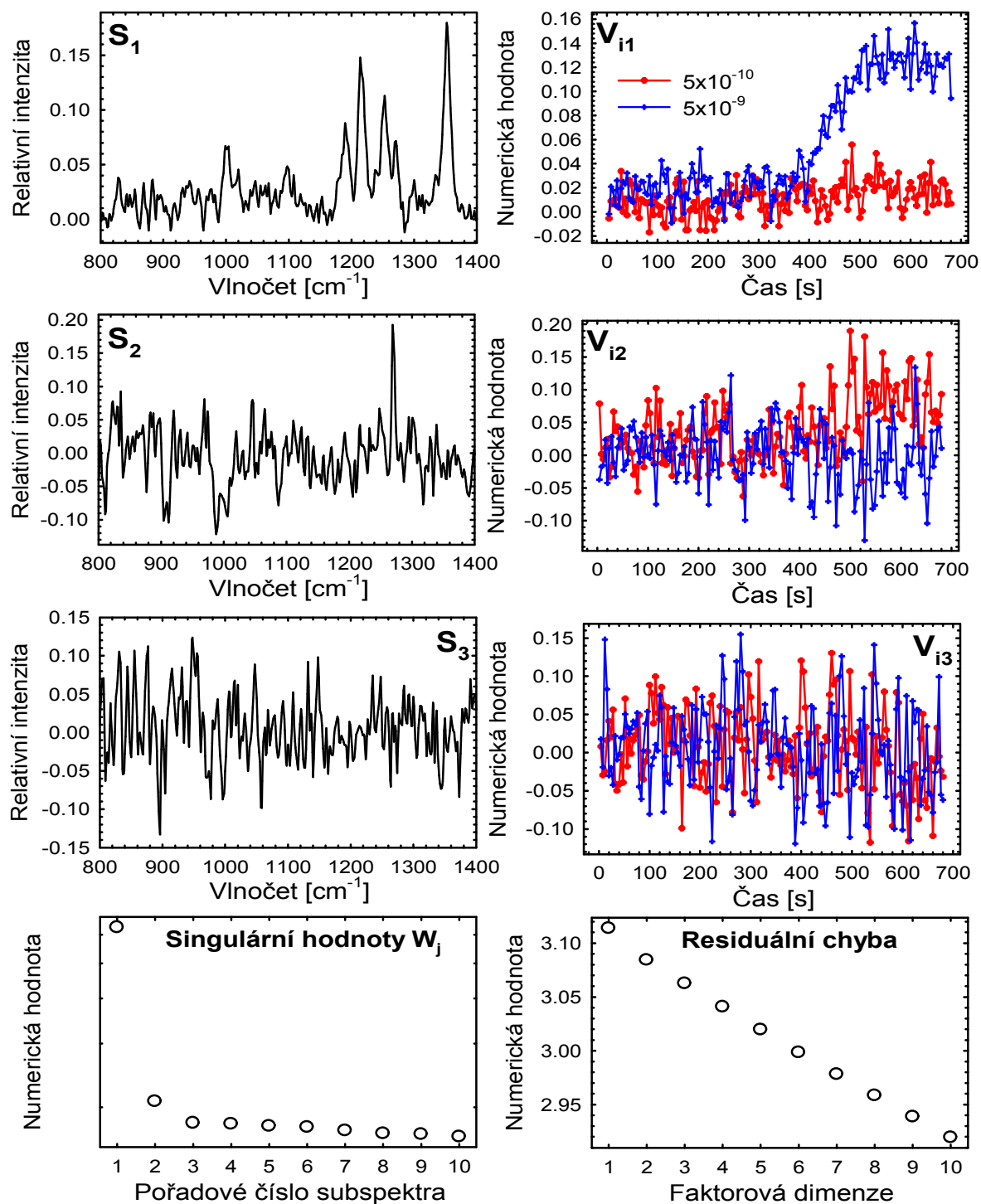


Obrázek 22 Vývoj systému hydrosol Ag → hydrosol Ag/ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-6}$ M) → hydrosol Ag/ ZnTMPyP ($c_M=5 \cdot 10^{-6}$ M)/NaCl, třetí spektrální komponenta.

Stejná analýza byla provedena pro systém o koncentraci ZnTMPyP $c_M=5 \cdot 10^{-8}$ M (obrázek 23) a společně pro systémy o koncentraci ZnTMPyP $c_M=5 \cdot 10^{-9}$ M a $c_M=5 \cdot 10^{-10}$ M (obrázek 24)



Obrázek 23 Vývoj systému hydrosol $\text{Ag} \rightarrow \text{Ag/ZnTMPyP}$ ($c_M = 5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) $\rightarrow \text{Ag/ZnTMPyP}$ ($c_M = 5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$)/NaCl.



Obrázek 24 Společná faktorová analýza vývoje systému hydrosol Ag → hydrosol Ag/ ZnTMPyP ($c_M=5.10^{-9}$ M) → hydrosol Ag/ ZnTMPyP ($c_M=5.10^{-9}$ M)/NaCl a systému hydrosol Ag → hydrosol Ag/ ZnTMPyP ($c_M=5.10^{-10}$ M) → hydrosol Ag/ ZnTMPyP ($c_M=5.10^{-10}$ M)/ NaCl.

4.7.3. Závěry z faktorové analýzy

1. Z naměřených koncentračních závislostí vyplývá, že přidání ZnTMPyP k hydrosolu Ag NČ vede k objevení se k SERRS signálu. Nárůst signálu na jeho maximální úroveň probíhá exponenciálně s časem, přičemž podrobná analýza průběhů ukázala, že se pravděpodobně jedná o dvouexponenciální nárůst s časovými konstantami řádově odlišnými (rychlejší v řádu sekund, pomalejší v řádu desítek sekund). V každém případě bylo ověřeno, že po uplynutí cca 4 minut lze systém z hlediska intenzity celkového SERS signálu považovat za stabilizovaný. FA ukázala, že pro studované koncentrace lze systém charakterizovat pouze jednou spektrální komponentou připisanou molekulám ZnTMPyP adsorbovaným na povrch neagregovaných nanočástic. Signál tohoto typu byl detekovatelný pouze do koncentrace $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$.

2. Přidání agregačního činidla NaCl vede k dalšímu výraznému nárůstu SERS signálu, přičemž faktorová analýza ukazuje objevení se dalších dvou spektrálních komponent. Pokud byla koncentrace ZnTMPyP vyšší než $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, počáteční nárůst přechází postupně do poklesu celkové intenzity. Pokud byla koncentrace ZnTMPyP vysoká, nárůst signálů byl rychlejší, ale následný pokles výraznější. Nové spektrální komponenty pravděpodobně odpovídají molekulám ZnTMPyP nacházejícím se v různém okolí. Poměrně prudké změny v jejich zastoupení v časovém intervalu desítek vteřin po přidání NaCl mohou odrážet dramatické změny v jejich relativních orientacích vůči povrchu nanočástic, ke kterým v procesu konstituce „hot spots“ dochází. Následný pokles signálu je možno připsat fotodynamickým (přemísťování ZnTMPyP v „hot spots“ v důsledku silných lokálních polí), fotochemickým (rozklad ZnTMPyP) nebo termálně indukovaným procesům (desorpce ZnTMPyP) probíhajícím v „hot spots“. Tomu by odpovídala závislost tohoto poklesu na době expozice, kdy podle časových průběhů SPE spekter systém nevykazuje další vývoj plasmonové resonance.

3. Pro nízké koncentrace ZnTMPyP, které bez agregačního činidla neposkytovaly žádný SERS signál, byl nárůst signálu poloviční, ale na druhou stranu nedocházelo k jeho poklesu při prodlužující se expozici. Jak je vidět ze společné faktorové analýzy systémů s ZnTMPyP o koncentracích $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ a $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-10} \text{ M}$, při koncentracích nižších než $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ už ZnTMPyP není detekovatelný ani v systému s kompaktními agregáty. Tuto koncentraci možno považovat za mez detekce ZnTMPyP v systému s NaCl, tj. s kompaktními agregáty.

4.7.4. SERS spektra systémů hydrosol Ag NČ, hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP, hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl – excitační vlnová délka 532 nm – dynamické měření

Při experimentu bylo postupováno analogicky jako v oddíle 4.7.1..

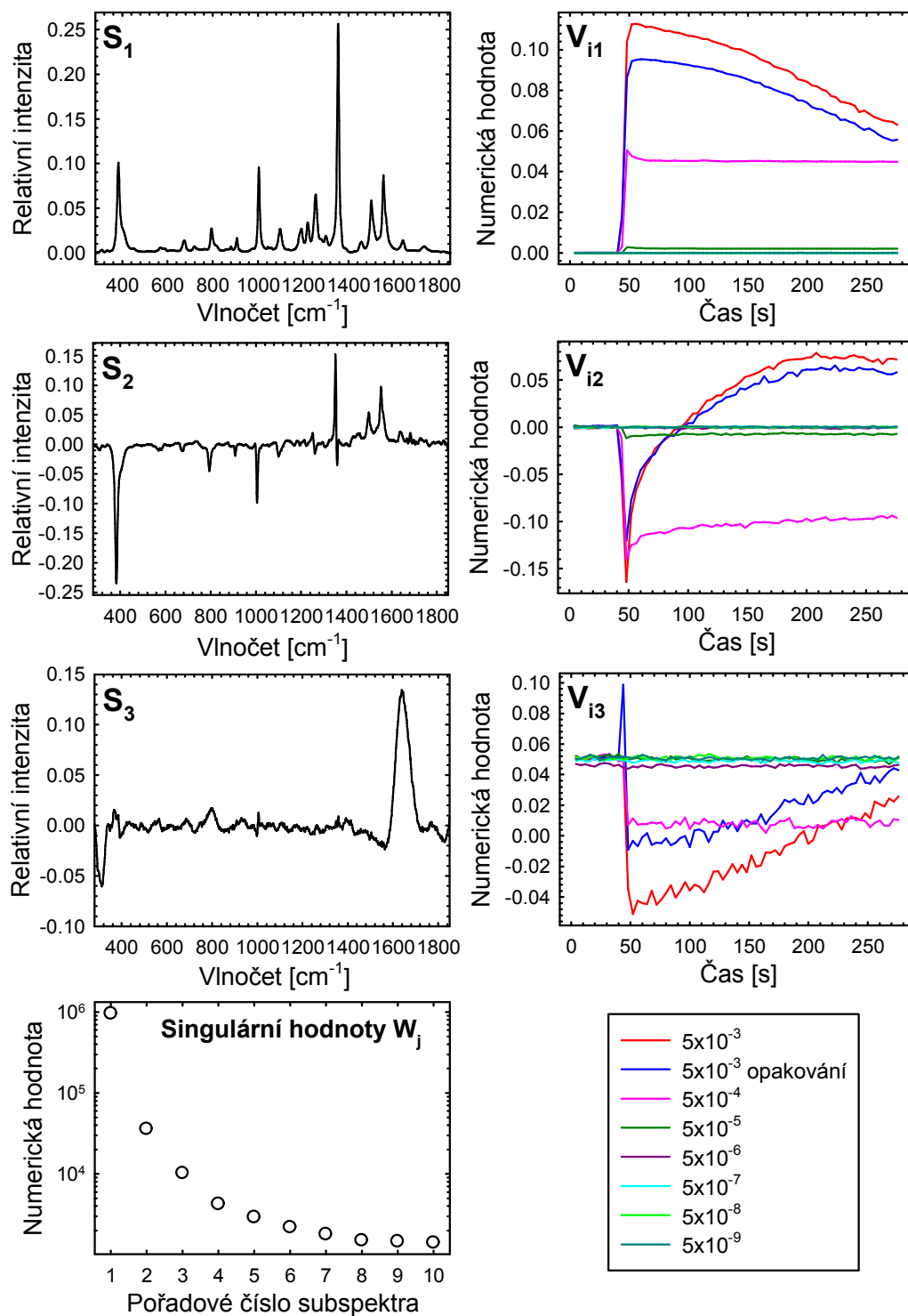
Na obrázku 25 je možno pozorovat časově závislý vývoj systému hydrosol Ag/ ZnTMPyP ($c_M = 5 \cdot 10^{-3}$ až $5 \cdot 10^{-8}$) při excitační vlnové délce 532 nm. Pro koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ M byla do společné faktorové analýzy zahrnuta dvě měření.

Z časově závislých vývojů systému hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP (obrázky 25, 26 a 27) je možno zjistit mez SERS spektrální detekce. Pro systém hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP je mez SERS spektrální detekce pro systém hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP $5 \cdot 10^{-5}$ pro excitační vlnovou délku 532 nm M. Při koncentracích $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-6}$ M a nižších již není možno pozorovat pásy ZnTMPyP. Při nejvyšších koncentracích $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-3}$ M je vidět výrazný pokles signálu s prodlužující se dobou expozice až na úroveň ca 55% maximální hodnoty, ale už pro koncentraci $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-4}$ M zůstává signál konstantní. Pokles signálu u $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-3}$ M je tak velký, že v okamžiku přidání NaCl (280 s) je přibližně stejně velký jako pro neměnicí se signál $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-4}$ M.

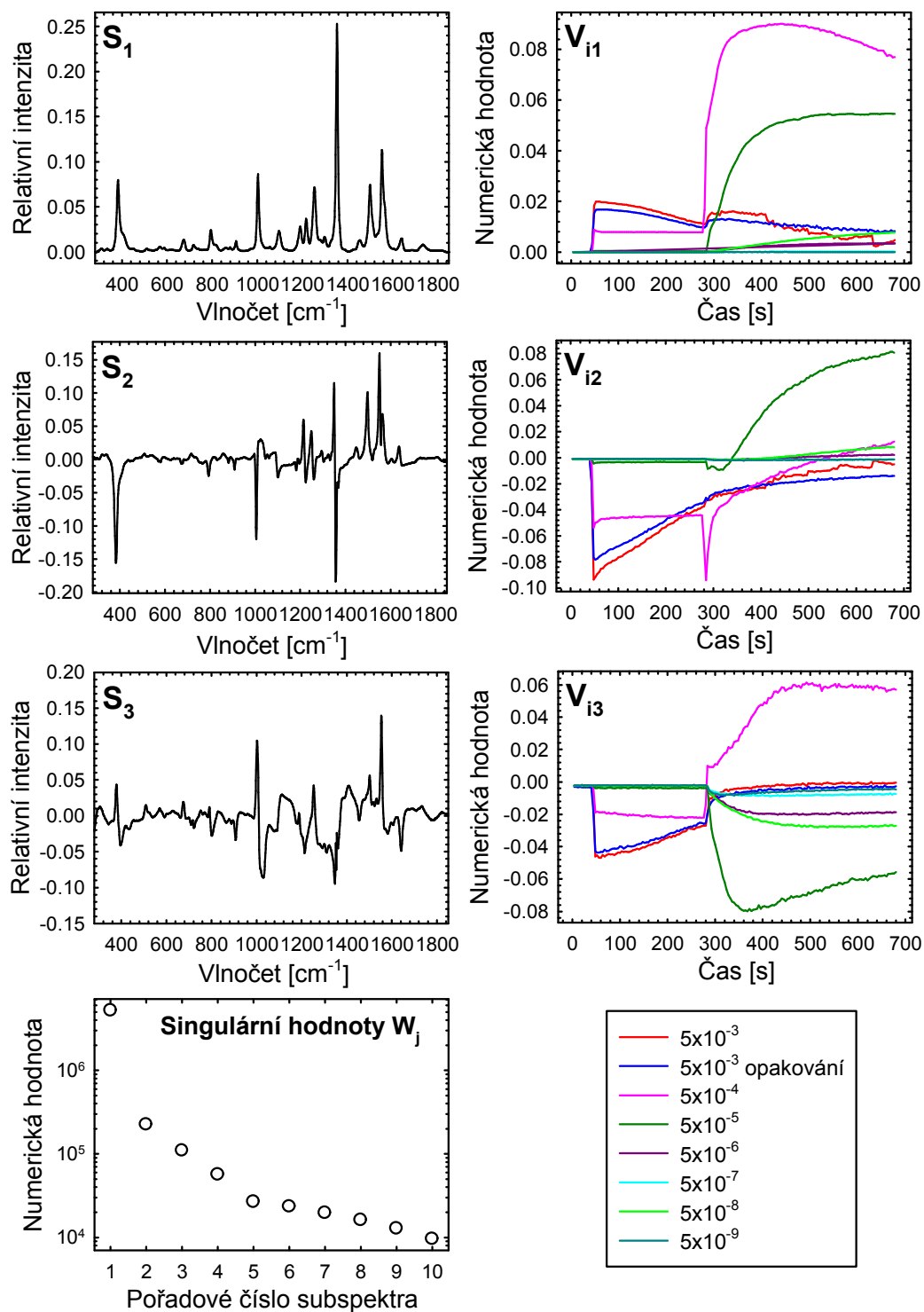
Faktorová analýza odhalila tři signifikantní spektrální komponenty, z nichž třetí odpovídá nejspíš signálu vody. Druhá komponenta má charakter diferenčního spektra s kladnými pásy u vyšších vlnočtů a zápornými u vlnočtů nižších. Intenzity pásů pro vyšší vlnočty jsou relativně větší pro $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-3}$ M než pro nižší koncentrace. Maxima v dosažených intenzitách mají stejnou posloupnost jako koncentrace ZnTMPyP.

Po přidání NaCl do systému dochází k dalšímu nárůstu SERS intenzity, ale pouze pro koncentrace $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-4}$ M (relativní zesílení 11 \times) a nižších koncentrací ZnTMPyP (obrázek 26). Tento nárůst signálu lze připsat tvorbě kompaktních agregátů a včleňování molekul ZnTMPyP do těchto agregátů. U obou systémů s koncentrací $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-3}$ M (u kterých byl signál před přidáním NaCl nejvyšší) naopak dochází k poklesu signálu. Pokles signálu se s prodlužující dobou expozice po přidání NaCl objeví i pro koncentraci $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-4}$ M, jak je vidět z obrázku 26. Je možno usuzovat, že s klesající koncentrací se relativní zesílení signálu přidáním NaCl zvyšuje. Např. pro $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-5}$ M dojde k zesílení 170 \times , ale koncentrační posloupnost (po přidání NaCl) už není konzistentní, protože např. pro $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-8}$ M je celkový signál vyšší než pro $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-7}$ i $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-6}$ M (obrázek 27). V případě vzorků o $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-8}$ M se pravděpodobně jednalo o chybné měření. Mez SERS spektrální

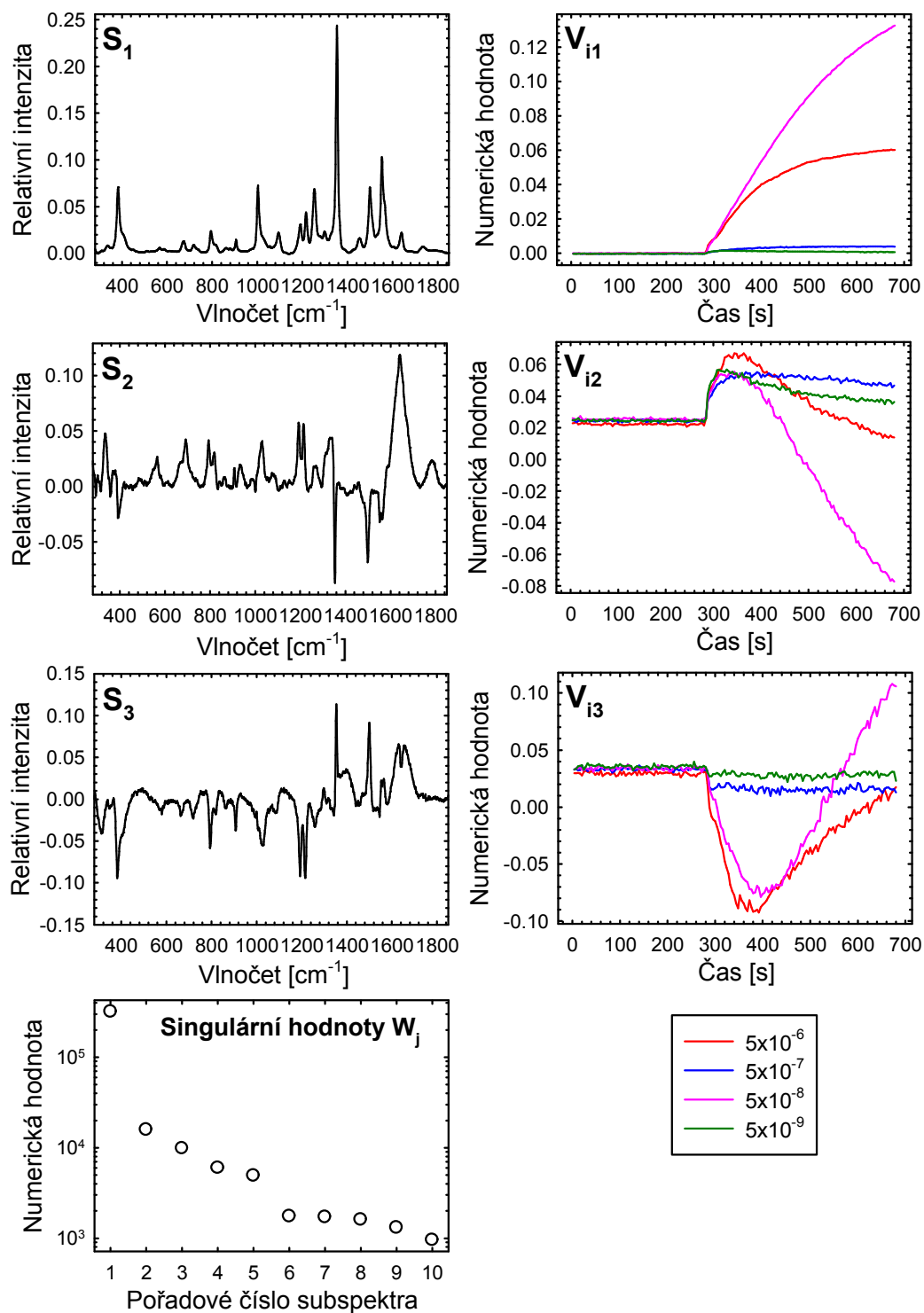
detekce tak zřejmě činí $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, tedy asi o dva řády nižší než v systému bez NaCl, tedy s izolovanými NČ. Tato mez SERS spektrální detekce je o 1 řád nižší než mez detekce určená pro tento systém ze stacionárních měření.



Obrázek 25 Výsledky společné faktorové analýzy časově závislých vývojů SERS spekter pro různé koncentrace ZnTMPyP pro systém hydrosol Ag NČ → hydrosol Ag NČ/ZnTMPyP.



Obrázek 26 Výsledky společné faktorové analýzy časových vývoji SERS spekter pro různé koncentrace ZnTMPyP v systému hydrosol Ag NČ → hydrosol AgNČ/ZnTMPyP. Okamžiky přidání ZnTMPyP (40 s) a aggregačního činidla (280 s) jsou dobře patrné ze skoků a zlomů v průbězích koeficientů V_{ij} .



Obrázek 27 Detailní analýza časových vývoji pro systémy hydrosol Ag NČ → hydrosol Ag/ ZnTMPyP → hydrosol Ag/ ZnTMPyP/ NaCl (o koncentraci $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-6}$ M až $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-9}$ M. Systémy s $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-7}$ a $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-9}$ M nevykazovaly žádný SERS signál na rozdíl od systémů $c_M=5 \cdot 10^{-8}$ M, kde byl signál dokonce vyšší než pro $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-6}$ M.

4.7.5 Srovnání mezi SERRS a SERS spektrální detekce ze stacionárních a dynamických měření

Z tabulky 5 je možno porovnat meze detekce pro jednotlivé systémy a pro excitační vlnové délky 441,6 a 532 nm. Při porovnání s tabulkou 4 je možno vyhodnotit celkovou studii se ZnTMPyP. Mez RRS spektrální detekce pro excitační vlnovou délku 441,6 nm byla stanovena $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-5}$ M. Pro excitační vlnovou délku byla mez RRS ZnTMPyP stanovena $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-4}$ M.

Je možno konstatovat, že u systému s izolovanými nanočásticemi je mez SERRS spektrální detekce $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-7}$ M a po přidání chloridu sodného a vzniku kompaktních agregátů dochází ke snížení meze detekce o 2 řády na $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-9}$ M v případě použití excitační vlnové délky 441,6 nm. Dynamická měření potvrzují naměřené meze detekce pro excitační vlnovou délku 441,6 nm.

Dále je možno konstatovat, že mez SERS spektrální detekce pro systémy s izolovanými nanočásticemi činí $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-5}$ M pro excitační vlnovou délku 532 nm. Pro systém s kompaktními je mez SERS spektrální detekce určena pro $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-6}$ M pro excitační vlnovou délku 532 a stacionární měření. U dynamických měření s izolovanými nanočásticemi byla stanovena mez detekce totožně se stacionárními experimenty a to $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-5}$ M. U dynamických měření došlo u systémů s kompaktními agregáty k poklesu meze SERS spektrální detekce na $c_M(\text{ZnTMPyP})=5 \cdot 10^{-7}$ M.

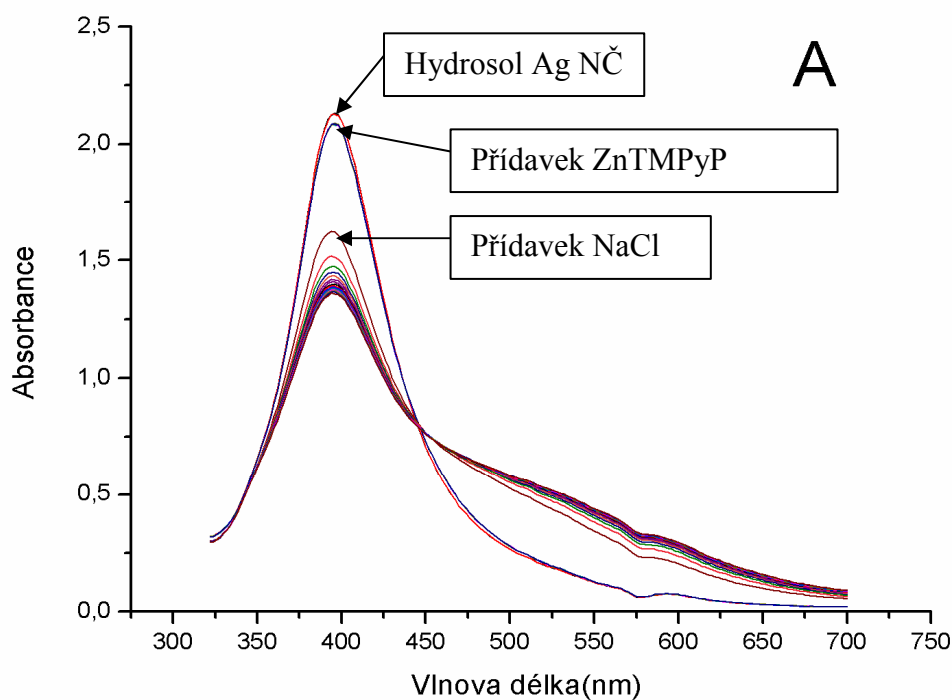
λ_{exc} (nm)	Typ experimentu	Ag NČ/ $c_M(\text{ZnTMPyP})$	Ag NČ/ $c_M(\text{ZnTMPyP})/\text{NaCl}$
441,6	stacionární	$5 \cdot 10^{-7}$ M	$5 \cdot 10^{-9}$ M
441,6	dynamické	$5 \cdot 10^{-7}$ M	$5 \cdot 10^{-9}$ M
532	stacionární	$5 \cdot 10^{-5}$ M	$5 \cdot 10^{-6}$ M
532	dynamické	$5 \cdot 10^{-5}$ M	$5 \cdot 10^{-7}$ M

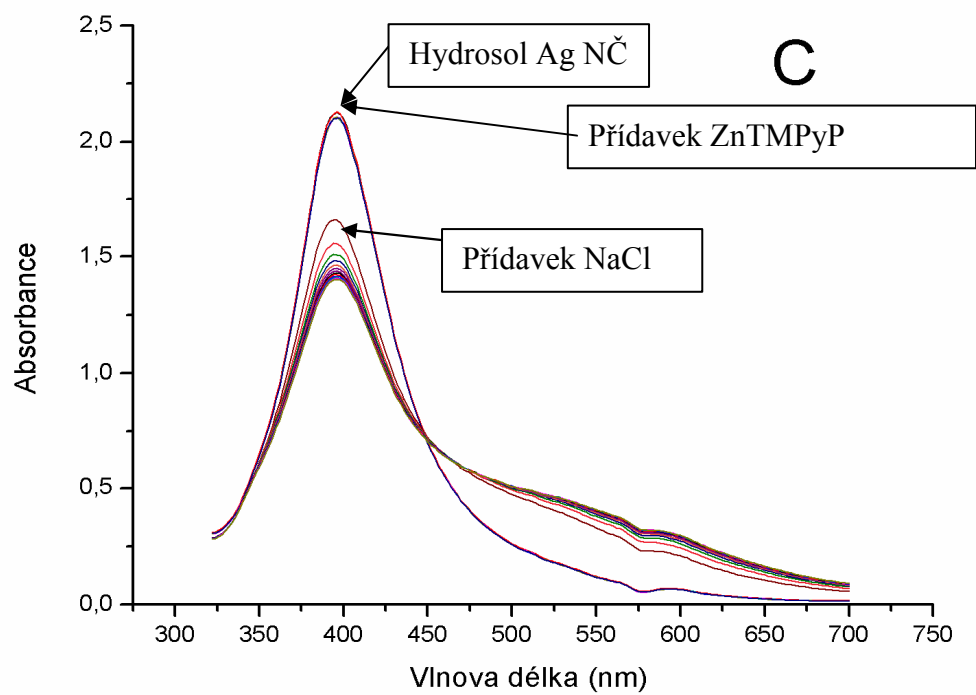
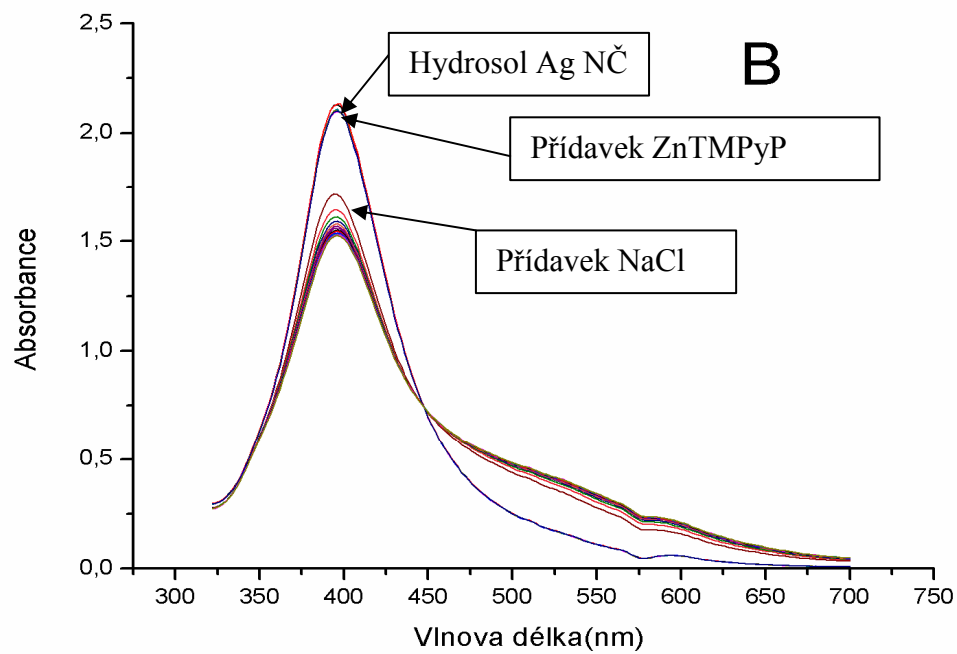
Tabulka 5 Srovnání mezi detekce ze stacionárních a dynamických měření.

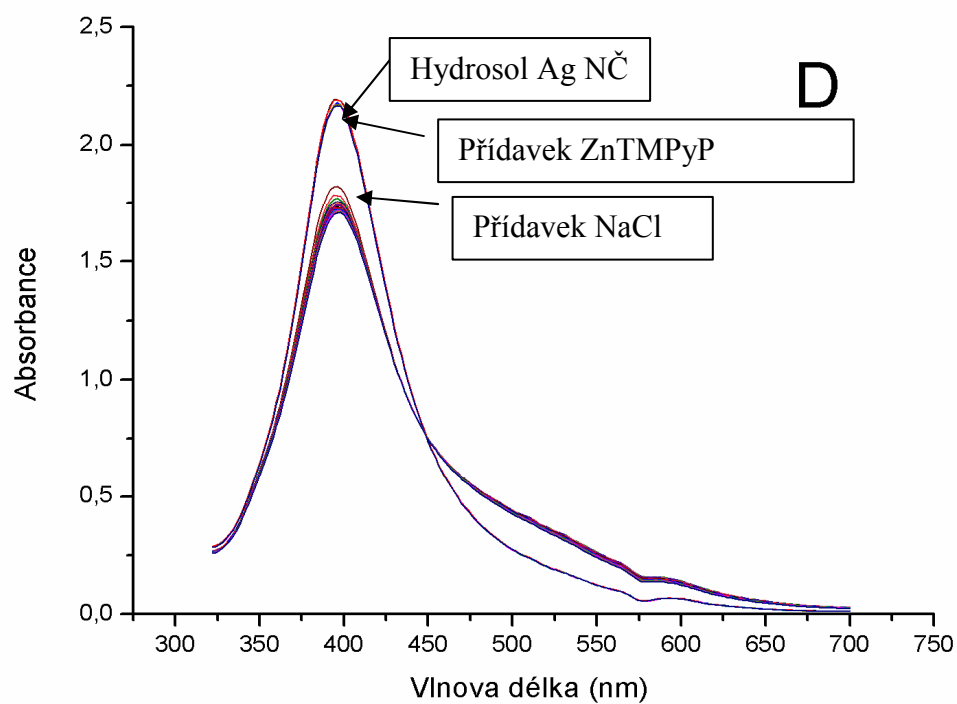
4.8. SPE systémů hydrosol Ag NČ, hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP a hydrosol Ag/ ZnTMPyP NaCl – dynamická měření

U systémů obsahující hydrosol Ag NČ, ZnTMPyP o koncentraci $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-6}$ M až $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-9}$ M a NaCl byla změřena SPE spektra. Nejprve se proměřila dvě SPE spektra hydrosolu Ag NČ. K hydrosolu Ag NČ bylo následně pomocí pipety přidáno 20 μl ZnTMPyP o dané koncentraci. Takto bylo změřeno dalších pět SPE spekter. Do tohoto systému bylo přidáno 100 μl 1M NaCl a bylo změřeno 13 SPE spekter, která jsou uvedena na obrázku 28 (A-D).

Při přidání ZnTMPyP do systému bylo vždy pozorováno malé poklesu absorbance (0,1). K výraznému poklesu absorbance a změně tvaru absorpční křivky došlo až po přidání chloridu sodného.

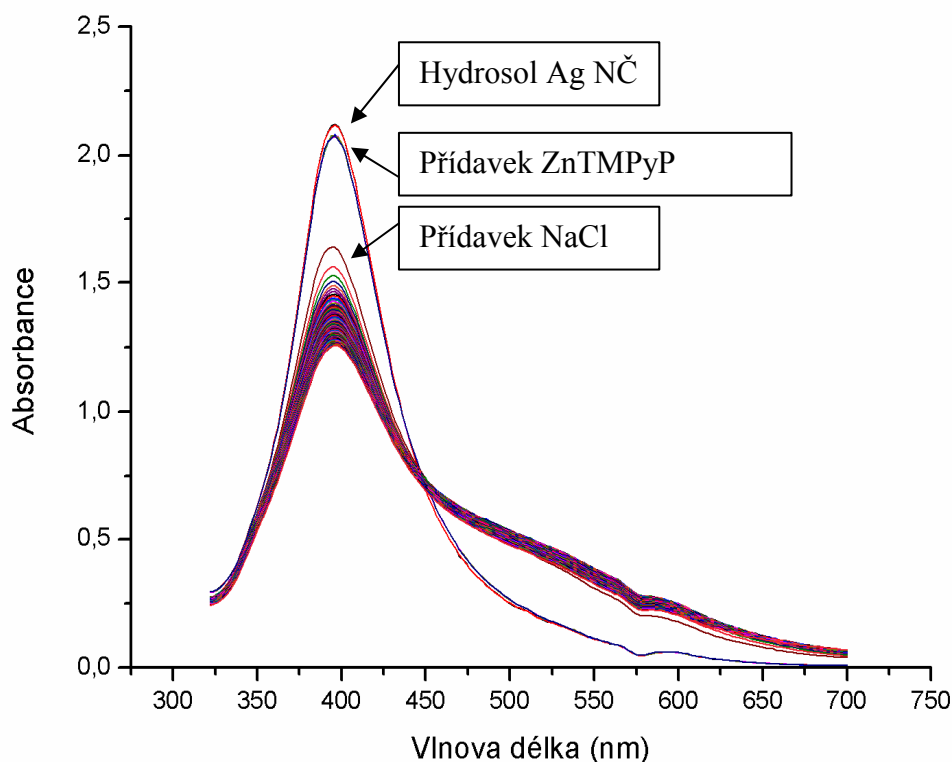






Obrázek 28 SPE spektra systémů hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl. ZnTMPyP měl koncentraci $c_M = 5 \cdot 10^{-6}$ M (A), $c_M = 5 \cdot 10^{-7}$ M (B), $c_M = 5 \cdot 10^{-8}$ M (C), $c_M = 5 \cdot 10^{-9}$ M (D).

U systému hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP ($c_M = 5 \cdot 10^{-6}$ M)/ NaCl bylo provedeno déle trvající měření. Toto měření potvrzuje, že absorbance i tvar křivka plasmonové extinkce se výrazně mění až po přidání chloridu sodného.

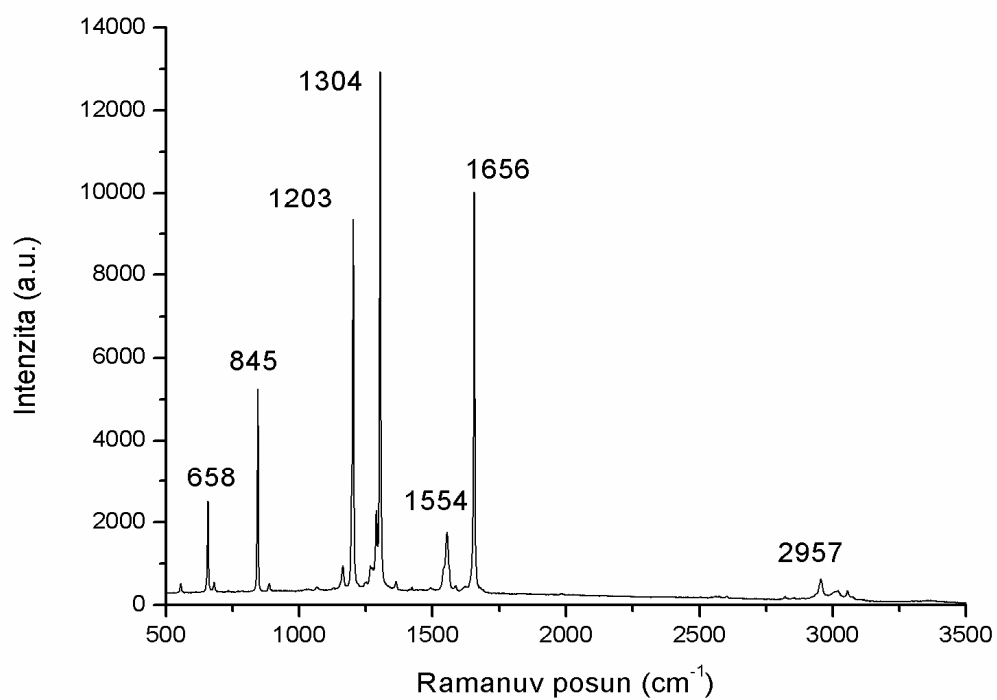


Obrázek 29 SPE spektrum systému: hydrosol Ag NČ, hydrosol Ag NČ/ZnTMPyP($c_M = 5 \cdot 10^{-6}$ M), hydrosol Ag NČ/ZnTMPyP($c_M = 5 \cdot 10^{-6}$ M)/NaCl. Experiment trval 47 minut.

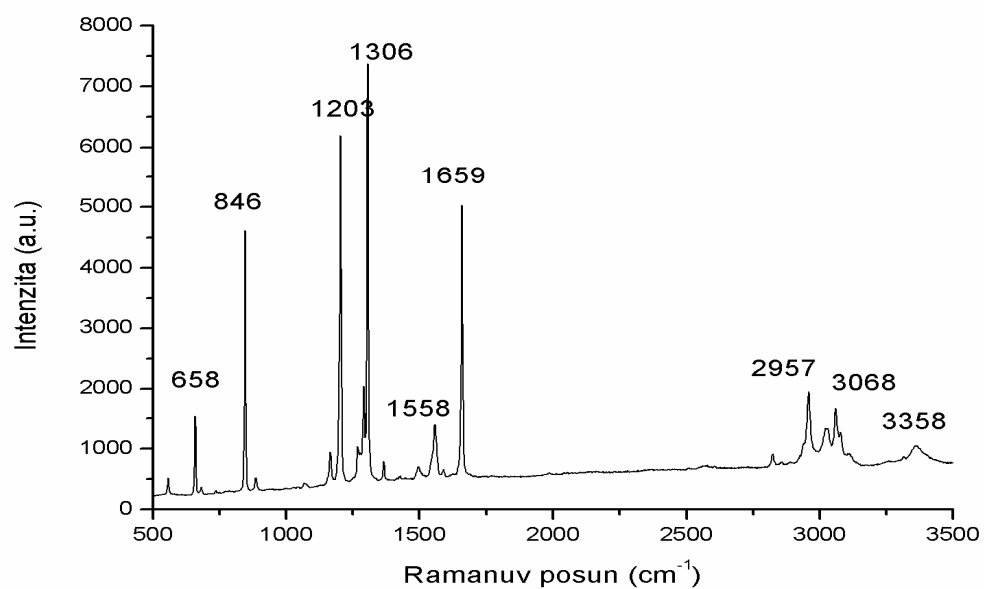
4.9. Výběr referentního nechromoforového adsorbátu

4.9.1. Ramanova spektroskopie methylviologenu

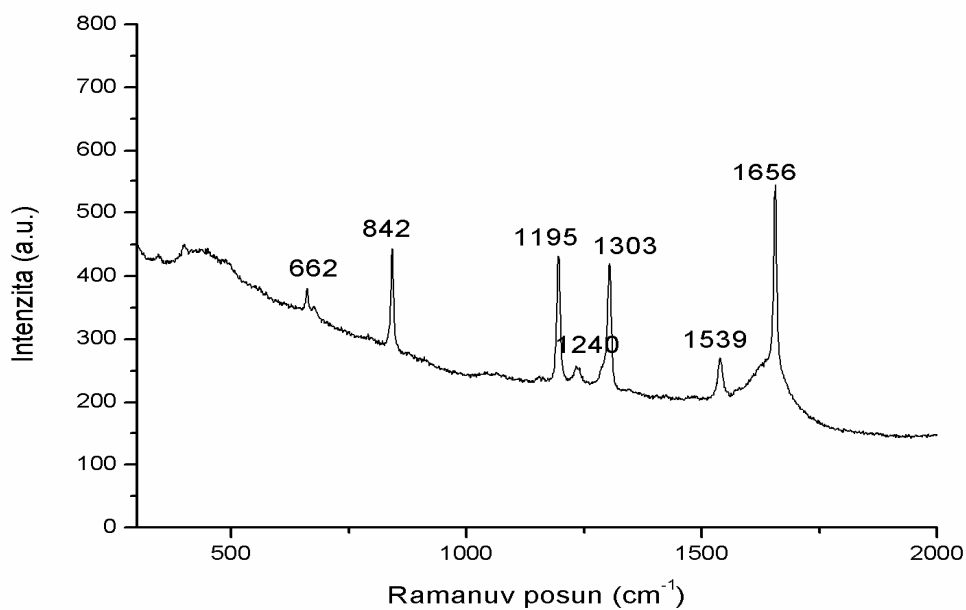
Methylviologen (dichlorid 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinia) byl původně vybrán jako kationový nechromofor. V průběhu studie se ukázalo, že při vyšších koncentracích methylviologenu jsou výsledky studií ovlivněny přítomností chloridů jako protiontů methylviologenového kationtu. U tohoto typu systému proto nebyly pořízeny snímky z TEM, ani zde nejsou uvedeny SERS studie. Ze spekter plasmonové extinkce (obrázek 34A) lze vidět, že při koncentraci methylviologenu $c_M = 5 \cdot 10^{-3}$ M dochází k agregaci Ag NČ v systému. Toto je pravděpodobně způsobeno přítomností chloridů ve vzorku. Kromě měření SPE byla změřena Ramanova spektra methylviologenu na Ramanově mikrospektrometru (obrázky 30-34 a 36) a rovněž elektronové absorpční spektra methylviologenu (obrázek 35).



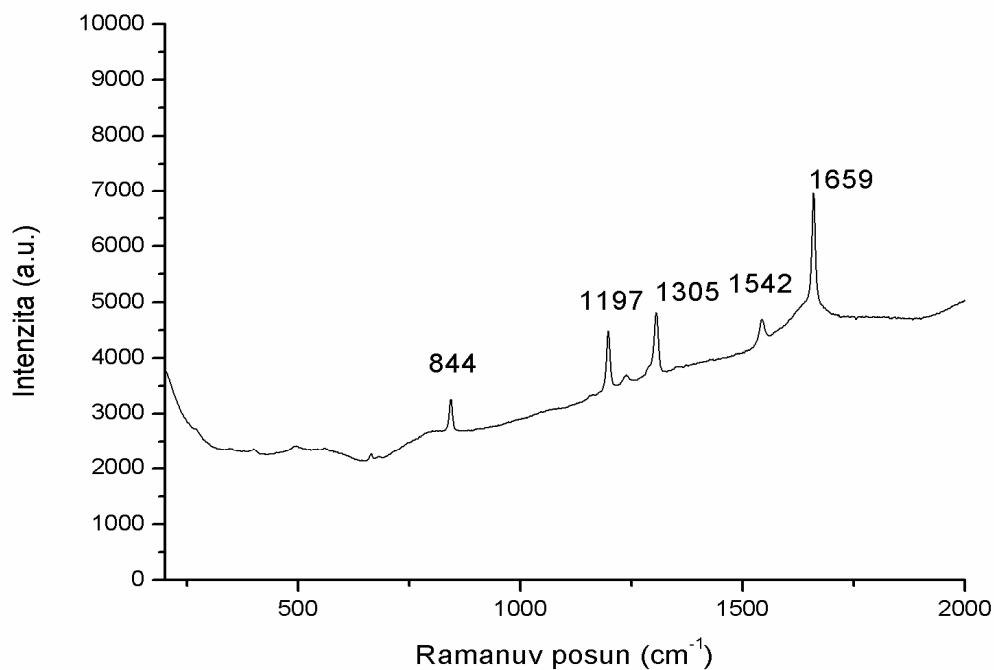
Obrázek 30 Spektrum krystalického methylviologenu pořízené pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. Excitační vlnová délka $\lambda = 632,8$ nm.



Obrázek 31 Spektrum krystalického methylviologenu pořízené pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. Excitační vlnová délka $\lambda = 514,5$ nm.



Obrázek 32 Spektrum vodného roztoku methylviologenu $c_M=5 \cdot 10^{-2}$ M pořízené pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. Excitační vlnová délka $\lambda=632,8$ nm.

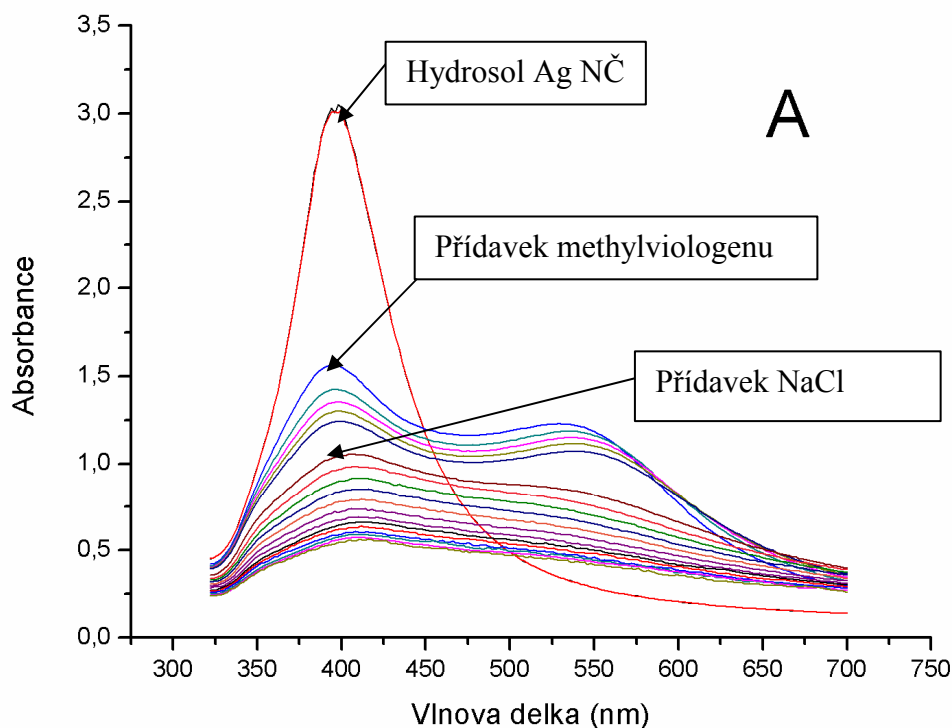


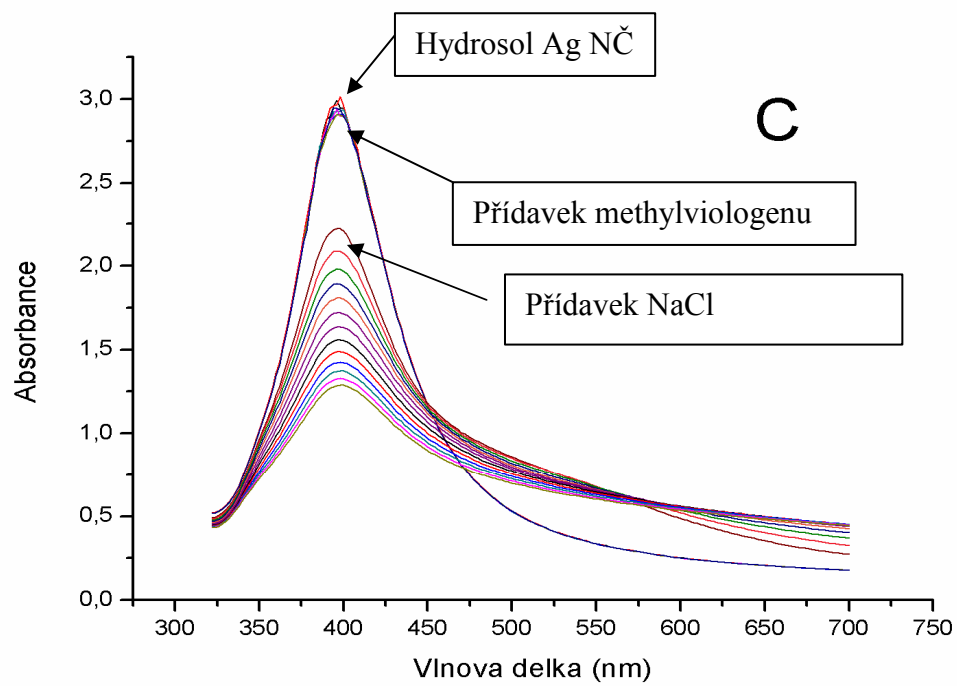
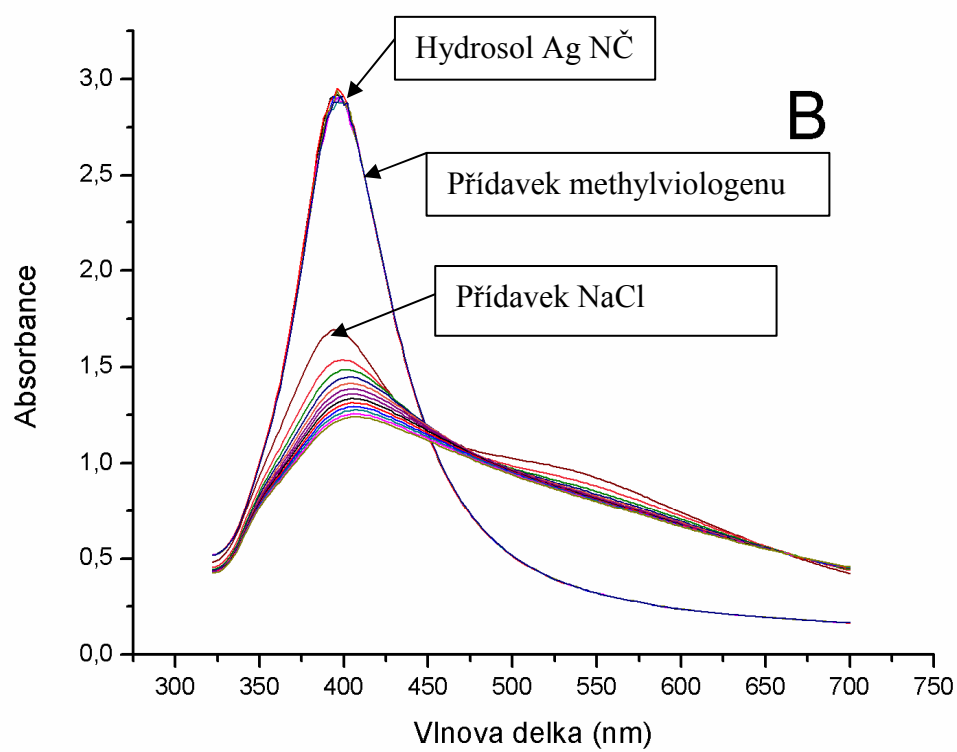
Obrázek 33 Spektrum vodného roztoku methylviologenu $c_M=5 \cdot 10^{-2}$ M pořízené pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. Excitační vlnová délka $\lambda=514,5$ nm.

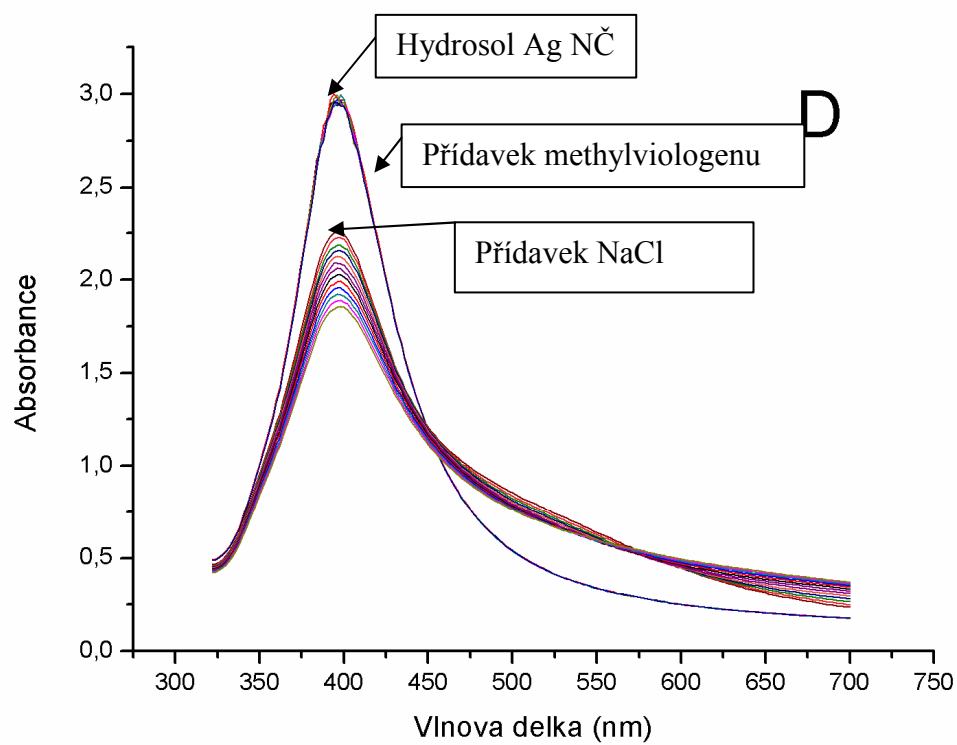
4.9.2 SPE systémů hydrosol Ag NČ, hydrosol Ag NČ/ methyviologen a hydrosol Ag NČ/ methylviologen/ NaCl – dynamická měření

U systémů o koncentraci $c_M(\text{methylviologen}) = 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ až $c_M(\text{methylviologen}) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ byla změřena SPE spektra. Nejprve se proměřila dvě SPE spektra hydrosolu Ag NČ. K hydrosolu Ag NČ bylo následně pomocí pipety přidáno 20 μl methylviologenu o dané koncentraci. Takto bylo změřeno dalších pět SPE spekter. Do tohoto systému bylo přidáno 100 μl 1M NaCl a bylo změřeno 13 SPE spekter, která jsou uvedena na obrázku 34 (A-D).

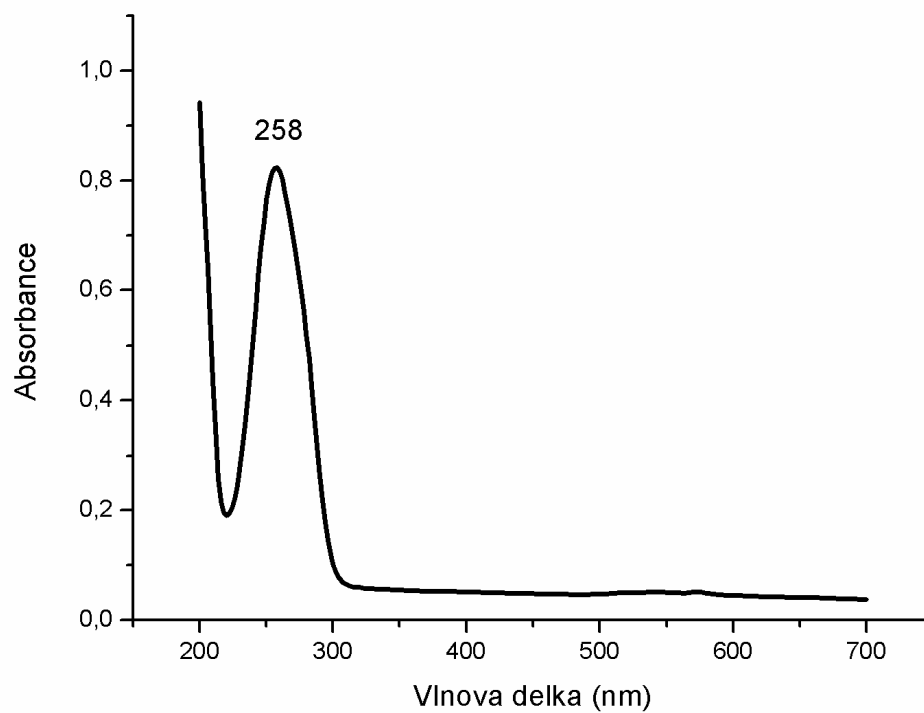
Při přidání methylviologenu o koncentraci $c_M(\text{methylviologen}) = 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ do systému bylo pozorováno výrazného poklesu absorbance (až o 1,5) – viz obrázek 34(A). U systémů o koncentraci $c_M(\text{methylviologen}) = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ až $c_M(\text{methylviologen}) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ - viz obrázek 34 (B-D) docházelo k poklesu absorbance a změně tvaru absorpční křivky až po přidavku chloridu sodného. Lze usuzovat, že při koncentraci $c_M(\text{methylviologen}) = 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ dochází k poklesu absorbance z důvodů velkého množství chloridových iontů vázaných na methylviologenu.





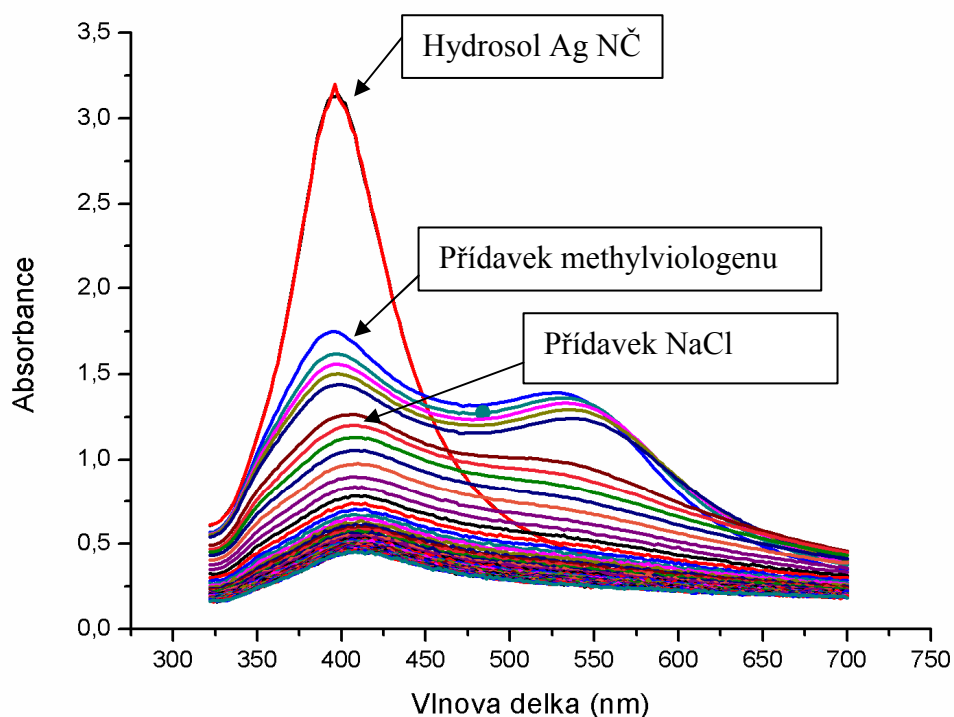


Obrázek 34 SPE spektra systémů hydrosol Ag NČ/ methylviologen/ NaCl. Methylviologen měl koncentraci $c_M=5 \cdot 10^{-3}$ M (A), $c_M=5 \cdot 10^{-4}$ M (B), $c_M=5 \cdot 10^{-5}$ M (C), $c_M=5 \cdot 10^{-6}$ M (D).



Obrázek 35 UV/Vis spktrum methylviologenu o koncentraci $5 \cdot 10^{-5}$ M.

Bylo rovněž provedeno déle trvající měření systému hydrosol Ag NČ/ methylviologen($c_M=5 \cdot 10^{-3}$ M)/ NaCl. Toto spektrum je ve shodě s obrázkem 34(A).



Obrázek 36 Spektrum plasmonové extinkce systému Ag/NČ/ methylviologen $c=5 \cdot 10^{-3}$ M/NaCl. Experiment probíhal 47 minut.

4.9.3. Testování EMIM jako referentního nechromoforového adsorbátu

Jako náhradní látka místo methylviologenu byl vybrán EMIM (1-ethyl-3-methylimidazolium). Tato látka byla vybrána jako další možný kationtový nechromofor a byly proměřeny systémy hydrosol Ag NČ/ EMIM a hydrosol Ag NČ/ EMIM/ NaCl pomocí SERS a SPE. Přestože dříve publikované práce prezentují SERS⁵¹ spektra imidazoliového kationtu, ukázalo se, že EMIM v studovaných systémech s Ag NČ neposkytuje SERS.

5. Závěr

1. Studium SPE spekter systému hydrosol Ag NČ/ ZnTMPyP v závislosti na koncentraci ZnTMPyP ukázalo, že v případě že je koncentrace ZnTMPyP vyšší než $c_M = 5 \cdot 10^{-7}$ M dochází k agregaci Ag NČ v systému. Při nižší koncentraci ZnTMPyP již k agregaci na Ag NČ nedochází. Systémy s nízkými koncentracemi ZnTMPyP jsou tedy tvořeny izolovanými nanočásticemi.

2. Studium dynamického vývoje SPE spekter systémů Ag NČ (hydrosol) \rightarrow Ag NČ/ ZnTMPyP \rightarrow Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl s nízkými koncentracemi ZnTMPyP, ukázalo, že přidavkem NaCl přechází systém s izolovanými Ag NČ na systém s kompaktními agregáty Ag NČ.

3. Faktorová analýza dynamického vývoje SERRS ($\lambda_{exc} = 441,6$ nm) a SERS ($\lambda_{exc} = 532$ nm) spekter ZnTMPyP v systému Ag NČ (hydrosol) \rightarrow Ag NČ/ ZnTMPyP \rightarrow Ag NČ/ ZnTMPyP/ NaCl ukázala následující výsledky:

(i) Byl detekován výrazný nárůst signálu ZnTMPyP spojený s přidavkem NaCl, tedy s konverzí systému s izolovanými nanočásticemi na systémy s kompaktními agregáty Ag NČ. Nárůst signálu je pozorován při obou λ_{exc} a je připisován lokalizaci ZnTMPyP do velmi silných optických polí vznikajících v kompaktních agregátech Ag NČ po optické excitaci.

(ii) V případě systémů s nejvyššími koncentracemi ZnTMPyP byl nárůst signálu následován jeho poklesem. Tento pokles je možno připsat fotodynamickým (přemísťování ZnTMPyP v „hot spots“ v důsledku silných lokálních polí), fotochemickým (rozklad ZnTMPyP) nebo termálně indukovaným procesům (desorpce ZnTMPyP) probíhajícím v „hot spots“. Tomu by odpovídala závislost tohoto poklesu na době expozice, kdy podle časových průběhů SPE spekter systém nevykazuje další vývoj plasmonové resonance.

(iii) Byla zjištěna přítomnost dalších spektrálních forem ZnTMPyP ve velmi krátkých časech po přidavku NaCl, tj. při konverzi izolovaných Ag NČ na kompaktní agregáty. Jejich přítomnost je připisována změnám orientace ZnTMPyP vůči povrchu Ag NČ či optickým polím mezi nanočásticemi spojeným se změnou morfologie Ag NČ.

4. FA byly rovněž určeny meze SERRS ($\lambda_{exc} = 441,6$ nm) a SERS ($\lambda_{exc} = 532$ nm) spektrální detekce ZnTMPyP v obou typech systémů a porovnány s hodnotami mezí detekce ze stacionárních měření. V případě systémů s izolovanými nanočásticemi byla mez SERRS spektrální detekce stanovena na $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-7}$ M pro excitační vlnovou délku 441,6 nm. V případě kompaktních agregátů, tzn. systémů vzniklých přidavkem NaCl do systému,

činila mez SERRs spektrální detekce $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-9}$ M. Tyto meze detekce byly stanoveny jak pro stacionární, tak i pro dynamická měření. Pro excitační vlnovou délku 532 nm byla stanovena mez SERRS spektrální detekce pro systémy s izolovanými nanočásticemi $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-5}$ M. Pro systémy s kompaktními agregáty byla stanovena mez SERS spektrální detekce $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-6}$ M u stacionárních měření. U dynamických měření poté došlo ke snížení meze detekce o 1 řád na $c_M(\text{ZnTMPyP}) = 5 \cdot 10^{-7}$ M. Výrazný pokles mezi SERRS a SERS spektrální detekce ZnTMPyP v systému s kompaktními agregáty oproti systému s izolovanými nanočásticemi je plně v souladu s pozorovaným nárůstem intenzity SERRS a SERS signálu a je vysvětlen lokalizací ZnTMPyP do velmi silných optických polí („hot spots“) v kompaktních agregátech.

5. Testovací studie SERS a SPE spekter systémů s Ag NČ a kationty 1,1'-dimethyl 4,4'-bipyridinia (methylviologenu) a 1-ethyl-3-methylimidazolia (EMIM) pak prokázaly, že tyto kationty nejsou vhodnými referentními nechromoforovými adsorbáty pro SERS spektrální studie. V prvním případě dochází při vyšších koncentracích k agregaci hydrosolu Ag NČ chloridovými anionty coby protiionty methyviologenového kationtu a nelze tudíž připravit systémy s izolovanými Ag NČ. V druhém případě nebyl pozorován SERS signál EMIM ani při vysokých koncentracích.

6. Seznam použité literatury

1. Fleischmann, M.; Hendra, P.; McQuillan, A. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26*, 163.
2. Jeanmarie, D.; van Duyne, R. *J. Electroanal. Chem* **1977**, *84*, 1.
3. Albrecht, M.; Creighton, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5215.
4. Moskovits, M. *J. Chem. Phys.* **1978**, *69*, 4159.
5. Weitz, D.; Moskovits, M.; Creighton, J. Structure and chemistry at interfaces: new laser and optical technology. ; VHC Publisher: Peerfield Beach Florida, 1986;
6. Garrel, R. *Anal. Chem.* **1989**, *6*, 401.
7. Srnová-Šloufová, I.; Vlčková, B.; Bastl, Z.; Hasslett, T. L.: *Langmuir* **2004**, *20*, 3407.
8. Rock, L., Faulds, K., Garham, D.: *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 4415-4417
9. Liao, P.; et al. *Chem. Phys. Lett.* **1981**, *82*, 355.
10. Creighton J. A.: *Spectroscopy of Surfaces*, Edited by R. J. H. Clark and R. E. Hester, John Wiley & Sons. Ltd. (1991)
11. Weitz, D.; Garoff, S.; Gersten, A.; Nitzan, J. *J. Chem. Phys.* **1983**, *78*, 5324.
12. Baker, G.; Moore, D. *Anal. Bioanal. Chem* **2005**, *382*, 1751.
13. Stockam, M.; Shalae, V.; Moskovits, M.; Botet, R.; George, T. *Phys. Rev. B* **1992**, *46*, 2821.
14. Zhang, P.; Haslett, C.; Douketis, C.; Moskovits, M. *Phys. Rev. B* **1998**, *57*, 15513.
15. Xu, H.; Aizpurua, J.; Kaell, M.; Apell, P. *Phys. Rev. E* **2000**, *62*, 4318.
16. Johansson, P.; Xu, H.; Kaell, M. *Phys. Rev. B* **2005**, *72*, 035427.
17. Kaell, M.; Xu, H.; Johansson, P. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 510.
18. Xu, H.; Bjerneld, E.; Kaell, M.; Borjenson, L. *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83*, 4357.
19. Michaels, A.; Jiang, J.; Brus, L. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 11965.
20. Moskovits, M. *Rev. Mod. Phys.* **1985**, *57*, 783.

21. Moskovits, M.; Tay, L.; Yang, T.; haslett *Top. Appl. Phys.* **2002**, 82, 215.
22. Vlčková, B.; Pavel, I.; Sladková, M.; Šišková, K.; Šlouf, M. *J. Mol. Struct.* **2007**, 834, 42.
23. Aravind, P.; Nitzan, A.; Metiu, H. *Surf. Sci.* **1981**, 110, 198.
24. Šloufová, I.; Šišková, K.; Vlčková, B.; Štěpánek, J. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, 10, 2233.
25. Schmid, G., Ed. *Nanoparticles: From Theory to Application*, 1st ed.; Wiley: Weinheim, 2004.
26. Schneider, S.; Halbig, P.; Grau, H.; Nickel, U. *Photochem. Photobiol.* **1994**, 60 (6), 605.
27. Nersisyan, H. H.; Lee, J. H.; Son, H. T.; Won, C. W.; Maeng, D. Y. *Mater. Res. Bull.* **2003**, 38, 949.
28. Yu, D.; Yam, V. J. *Phys. Chem. B* **2005**, 109, 5497.
29. Peterson, M. S. M.; Bouwman, J.; Chen., A.; Deutsch, M. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, 306, 41.
30. Kvítek, L.; Pucek, R.; Panáček, A.; Novotný, R.; Hrbáč, J.; Zbořil, R. *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 1099.
31. Leopold, N.; Lendl, B. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 5723.
32. Evanoff, E. D.; Chumanov, J. *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 13948.
33. Cason, J. P.; Khambaswadkar, K.; Roberts, C. B. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, 39, 4749.
34. Li, X.; Zhang, J.; Xu, W.; Jia, H.; Wang, X.; Yang, B.; Zhao, B.; Li, B.; Ozaki, Y. *Langmuir* **2003**, 19, 4285.
35. Ahern A. A.; Garrell R. L. *Anal. Chem.* **1987**, 59, 2813.
36. Kvítek, L.; Novotný, R.; Píkal, P. *Chem. Listy* **1998**, 92, 431.

37. Cotton, T.M. ; Schultz, S. G. ; Van Duyne, R. P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 6528.
38. Kim, M.; Tsujino, T.; Itoh, K. *Chem Phys. Lett.*, **1986**, *125*, 364.
39. Hildebrandt, P.; Stockburger, M.. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 5935
40. Hikal, W.; Harmon, H. *Polyhedron* **2009**, *28*, 113.
41. Rochford, D. Chu; A. Hagfeldt; Galoppini, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4655.
42. Procházka, M.; Mojzeš, P.; Vlčková, B.; Turpin, P.Y. *J. Phys. Chem B.***1997**, *101*, 3161.
43. Vlčková, B.; Matějka, P.; Šimonová, J.,; Pančoška, P.; Čermáková, K.; Baumruk, V. *J. Phys. Chem.* **1997**, *97*, 9719.
44. Malinowski, E. *Factor Analysis in Chemistry*; Wiley: New York, 1991
45. Hanzlíková, J.; Procházka, M.; Štěpánek, J.; Baumruk, V.; Bok, J.; Anzebacher, P. Jr. *J. Raman Spectrosc.* **1998**, *29*, 575.
46. Hanuš, J.; Chmelová, K.; Štěpánek, J.; Turpin, P.-Y . Bok, J.; Rosenberg, I.; Točík, Z. *J. Raman Spectrosc.***1999**, *30*, 669.
47. Hanzlíková, J.; Procházka, M.; Štěpánek, J.; Baumruk, V.; Bok, J.; Anzebacher, P.Jr. *J. Raman Spectrosc* **1998**, *29*, 575.
48. Matějka, P. *Diplomová práce* **1989**, Univerzita Karlova v Praze.
49. Hikal, M. W., Harmon, H. J. *Polyhedron* **2009**, *28*, 113.
50. Blom, N.; Odo, J.; Nakamoto, K.; *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 2847.
51. Rubim, J.; Trindade, F.; Gelesky, M.; Aroca, R.; Dupont, J. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 19670.

7. Seznam použitých zkratk a symbol

a.u.	arbitrary units
EM	elektromagnetický mechanismus
FA	faktorová analýza
RS	Ramanův rozptyl
RRS	rezonanční Ramanův rozptyl
SERS	povrchem zesílený Ramanův rozptyl
SERRS	povrchem zesílený rezonanční Ramanův rozptyl
SP	povrchový plasmon
SPE	spektra extinkce povrchových plasmonů
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
Ag NČ	nanočástice stříbra
ZnTMPyP	Zn(II) 5,10,15,20–tetrakis(1-methyl–4pyridiniumyl) porfin (alternativně užívaný název: viz seznam chemikálií, jedná se o tetrakationtový porfyrin)
Methylviologen	dichlorid 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinia
EMIM	1-ethyl-3-methylimidazolium